



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

RONALD KEVERSON DA SILVA SANTOS

**UTILIZAÇÃO DE ÁGUA SUBCRÍTICA E MÉTODOS CONVENCIONAIS DE
EXTRAÇÃO PARA A VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO
DE GRAVIOLA (*Annona muricata*)**

Recife

2018

RONALD KEVERSON DA SILVA SANTOS

**Utilização de água subcrítica e métodos convencionais de extração para a valorização de
resíduos do processamento de graviola (*Annona muricata*)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito final à
obtenção do título de Mestre em Engenharia
Química.

Área de concentração: Engenharia de
Processos Químicos e Bioquímicos

Linha de pesquisa: Processos Químicos
Industriais

Orientador: Prof. Dr. Leandro Danielski

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Stragevitch

Recife

2018

Catálogo na fonte
Bibliotecária Maria Luiza de Moura Ferreira, CRB-4 / 1469

S237u

Santos, Ronald Keverson da Silva.

Utilização de água subcrítica e métodos convencionais de extração para a valorização de resíduos do processamento de graviola (*Annona muricata*) / Ronald Keverson da Silva. - 2018. 86 folhas, il., tabs., abr. e sigl.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Danielski.

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Stragevitch

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2018.

Inclui Referências.

1. Engenharia Química. 2. Graviola. 3. Compostos fenólicos. 4. Atividade antioxidante. 5. Água subcrítica. 6. Técnicas de extração. I. Danielski, Leandro (Orientador). II. Stragevitch, Luiz (Coorientador). III. Título.

660.2 CDD (22. ed.)

UFPE/BCTG/2018-379

**UTILIZAÇÃO DE ÁGUA SUBCRÍTICA E MÉTODOS CONVENCIONAIS DE
EXTRAÇÃO PARA A VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DE
GRAVIOLA (ANNONA MURICATA)**

Linha de pesquisa: Processos Químicos Industriais

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, defendida e aprovada em 10 de julho de 2018 pela banca examinadora constituída pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Leandro Danielski/DEQ-UFPE
(Orientador)

Prof. Dr. Luiz Stragevitch/DEQ-UFPE
(Coorientador)

Prof^a. Dr^a. Celmy Maria Bezerra de Menezes Barbosa/DEQ-UFPE
(Examinadora Interna)

Prof. Dr. Jorge Vinícius Fernandes Lima Cavalcanti/DEQ-UFPE
(Examinador Externo)

Prof^a. Dr^a. Patrícia Moreira Azoubel/DEQ-UFPE
(Examinadora Interna)

Dedico este trabalho ao Senhor. Sem ele não seria capaz de realizá-lo após todas as adversidades durante esta trajetória. E aos meus familiares, em especial meu pai, minha mãe e meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter me dado forças em momentos difíceis e complicados da minha vida.

Agradeço aos órgãos de fomento, CNPq e CAPES, destacando aqui a importância destes órgãos para o auxílio do pesquisador durante uma pesquisa. O Brasil, como um país riquíssimo e de grande potencial, mas que precisa investir muito mais em ciência, precisa se atentar a importância de se investir nesse setor para o desenvolvimento de uma nação.

Também agradeço ao meu orientador Leandro Danielski e ao coorientador Luiz Stragevitch, a todos os servidores Técnicos administrativos, aos Professores que fazem parte ou contribuem para o desenvolvimento e crescimento do curso de Engenharia de Química (UFPE). Além deles, gostaria de agradecer aos professores e amigos, em especial Luiz Soares e Magda Ferreira, que compõem o grupo de pesquisa em Farmacognosia, no Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE, por toda a contribuição para a conclusão desta etapa em minha vida.

Ofereço os mais sinceros agradecimentos aos meus amigos Alex Lucena, Rosângela e Robson, dona Fátima, Claudia Jessica, Rodrigo Duarte, aos colegas do Kinay e a turma do bairro por me ajudarem a chegar até aqui, com incentivos e contribuições.

Agradeço em especial a Caio Veloso e Fabrício Ferreira por seres meus amigos em qualquer situação, são dois amigos que considero de coração.

Gostaria de agradecer a pessoas especiais que tiveram um papel muito importante na minha vida: Angélica Santana, Luisa Rayane, Gleyciany Lima, Elizabeth Portela, Tereza Sobral e Priscilla André.

Peço a Deus que eu possa oferecer compreensão, carinho, dedicação e amor para todos aqueles que fazem parte da minha vida.

RESUMO

O presente trabalho teve como finalidade a extração de compostos e a avaliação da bioatividade dos extratos obtidos a partir de resíduos agroindustriais (sementes e folhas de graviola, *Annona muricata*) com métodos de extração a baixa (Soxhlet, infusão e extração com ultrassom) e altas pressões (água subcrítica). Inicialmente, sementes de graviola foram consideradas como matéria-prima e submetidas às extrações com todos os métodos supracitados. Os extratos obtidos a partir das sementes foram analisados por métodos cromatográficos e a presença de compostos fenólicos não foi confirmada. Assim, o trabalho voltou-se para a extração de compostos fenólicos das folhas de graviola utilizando os quatro métodos de extração apresentados. A quantidade de polifenóis totais de todos os extratos obtidos a partir das folhas foi avaliada pelo método de Folin-Ciocalteu e as atividades antioxidantes foram determinadas por dois métodos clássicos (DPPH e ABTS). Adicionalmente, cromatografia líquida de alta performance foi utilizada para a identificação e quantificação de compostos fenólicos. Dentre os extratos obtidos, as extrações Soxhlet com etanol apresentaram maior quantidade de polifenóis totais (2,37% de ácido gálico por grama), assim como atividades antioxidantes mais elevadas. Contudo, não foi a técnica de extração que apresentou o maior número de compostos extraídos. Os extratos obtidos com água subcrítica nos níveis máximos do planejamento fatorial (4 g de folhas de graviola, 150 °C e 225 bar) apresentaram onze picos definidos (compostos fenólicos). O componente rutina foi tomado como o mais representativo e seus teores foram determinados para todos os extratos obtidos. Novamente o método Soxhlet apresentou os teores mais elevados de rutina, o que justificou, em parte, uma maior atividade antioxidante dos extratos. Os resultados obtidos a partir de estudos de atividades antioxidantes sugeriram, portanto, que os extratos etanólicos e aquosos de *A. muricata* possuem considerável atividade antioxidante em função da presença de compostos fenólicos.

Palavras-chave: Graviola. Compostos fenólicos. Atividade antioxidante. Água subcrítica. Técnicas de extração.

ABSTRACT

The objective of the present work was the extraction of compounds and the bioactivity evaluation of the extracts obtained from agroindustrial residues (seeds and leaves of soursop, *Annona muricata*) at low (Soxhlet, infusion and ultrasound extraction) and high (subcritical water) pressures. Initially, soursop seeds were considered as raw material and subjected to extractions with all aforementioned methods. The extracts obtained from the seeds were analyzed by chromatographic methods and the presence of phenolic compounds was not confirmed. Thus, the work aimed to the extraction of phenolic compounds from soursop leaves using the same extraction methods. The amount of total polyphenols for all extracts obtained from the leaves was evaluated by the Folin-Ciocalteu method and the antioxidant activities were determined by two classical methods (DPPH and ABTS). In addition, high performance liquid chromatography was used for the identification and quantification of phenolic compounds. Among the extracts obtained, Soxhlet extractions with ethanol showed higher total polyphenols contents (2.37% gallic acid per gram), as well as higher antioxidant activities. However, it was not the extraction technique that presented the highest number of extracted compounds. The extracts obtained with subcritical water at the maximum levels (factorial design: 4 g of soursop leaves, 150 ° C and 225 bar) presented eleven defined peaks (phenolic compounds). Rutin was taken as the most representative phenolic compound and its contents were determined for the obtained extracts. The Soxhlet method presented the highest rutin content, which justified, in part, the higher antioxidant activity of the extracts. Therefore, the results obtained have suggested that the ethanolic and aqueous extracts of *A. muricata* present considerable antioxidant activity due to the presence of phenolic compounds.

Keywords: Soursop. Phenolic compounds. Antioxidant activity. Subcritical water. Extraction techniques.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Graviola (<i>Annona muricata</i>).....	16
Figura 2-	Acetogeninas que apresentam atividade farmacológica.....	18
Figura 3-	Múltiplos benefícios para a saúde através do consumo de fontes ricas de compostos bioativos.....	24
Figura 4-	Usos e aplicações de extratos de fontes naturais.....	25
Figura 5-	Esquema representativo da biossíntese dos compostos fenólicos- via chiquimato.....	27
Figura 6-	Esqueletos básicos de compostos fenólicos.....	30
Figura 7-	Reação de quantificação de fenólicos totais por reagente de Folin-Ciocalteu.....	31
Figura 8-	Estabilização do radical livre DPPH.....	33
Figura 9-	Estabilização do radical ABTS ⁺ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.....	34
Figura 10-	(A) Conceitualização de uma matriz natural e os possíveis locais em que pequenas moléculas podem ser encontradas; (B) Esquema do mecanismo de extração.....	36
Figura 11-	Curva cinética típica observada para a extração de produtos naturais em base livre de solvente.....	38
Figura 12-	Extrator Soxhlet.....	40
Figura 13-	Alcance da audição humana e ultrassom.....	41
Figura 14-	Cavitação em um meio homogêneo.....	43
Figura 15-	Diagrama de fases da água em função da temperatura e pressão.....	44
Figura 16-	Equipamento utilizado nos experimentos de extração assistida com ultrassom.....	47
Figura 17-	Esquema do equipamento utilizado para os experimentos com água subcrítica.....	48
Figura 18-	Equipamento utilizado para os experimentos com água subcrítica. 1) Reservatório de água; 2) Bomba de pressurização; 3) Pré-aquecedor; 4) Extrator; 5) Válvula micrométrica.....	49

Figura 19-	Resultados de CCD para os extratos de semente de graviola através de EASub para (A) derivados cinâmicos (1) e flavonoides (2); (B) taninos condensados; (C) taninos hidrolisados.....	55
Figura 20-	Resultados da CLAE para os extratos obtidos na extração das sementes de graviola por (A) Soxhlet e (B) infusão.....	56
Figura 21-	Resultados da CLAE para os extratos obtidos na extração de sementes de graviola usando (A) ultrassom e (B) água subcrítica.....	57
Figura 22-	Resultados da CLAE para a injeção isolada do padrão rotina.....	58
Figura 23-	Gráfico de Pareto dos efeitos significativos do planejamento fatorial 2^3 na extração com água subcrítica de folhas de graviola na análise de PFT.....	61
Figura 24-	Cubo das interações significativas do planejamento fatorial 2^3 para os experimentos de EASub.....	62
Figura 25-	Superfície de resposta do planejamento fatorial 2^3 para os experimentos de EASub.....	62
Figura 26-	Resultados da CLAE para os extratos obtidos na extração das folhas de graviola por (A) Soxhlet e (B) infusão.....	66
Figura 27-	Resultados da CLAE para os extratos obtidos na extração das folhas de graviola por (A) ultrassom e (B) água subcrítica.....	67
Figura 28-	Cromatograma para o padrão rotina em comparação com a EASub contaminada com rotina.....	68
Figura 29-	Espectros de varreduras para os picos (A) 3 e (B) 4 obtidos através de EASub.....	70
Figura 30-	Espectros de varreduras para os picos (A) 1 e (B) 2 obtidos através de EASub.....	71
Figura 31-	Espectro de varredura para o pico 10 obtido através de EASub.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Compostos bioativos isolados de <i>Annona muricata</i>	19
Tabela 2-	Extrações realizadas segundo a literatura à base de partes de <i>A. muricata</i> L. na obtenção de polifenóis totais (PFT) e atividades antioxidantes totais (AAT).....	22
Tabela 3-	Principais classes de compostos fenólicos e características químicas.....	28
Tabela 4-	Aplicação de água subcrítica na obtenção de compostos bioativos..	45
Tabela 5-	Sistemas, reveladores e padrões utilizados nas análises por CCD.....	50
Tabela 6-	Níveis e variáveis do planejamento fatorial completo 2^3	54
Tabela 7-	Níveis de codificação e médias dos polifenóis totais obtidos nos experimentos de EASub.....	60
Tabela 8-	Comparação dos métodos na extração de folhas de graviola (obtenção de polifenóis totais e atividades antioxidantes totais).....	63
Tabela 9-	Valores obtidos para a rotina por CLAE e correlação de Pearson....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2, 2-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico
AAT	Atividade antioxidante total
ACG	Acetogenina
AG	Ácido gálico
CCD	Cromatografia de camada delgada
CD	Controlado por difusão
CF	Compostos fenólicos
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EC ₅₀	Concentração mínima eficaz para redução de 50% na atividade
E.R.I.	Estimula a resposta imune
ES	Extração por Soxhlet
EI	Extração por infusão
EU	Extração por ultrassom assistida
EASub	Extração por água subcrítica
PFT	Polifenóis totais
TROLOX	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente à Trolox
TEC	Taxa de extração constante
TED	Taxa de extração decrescente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	<i>Objetivo geral.....</i>	15
1.2	<i>Objetivos específicos.....</i>	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1	<i>A graviola (Annona muricata).....</i>	16
2.2	<i>Compostos bioativos.....</i>	23
2.2.1	Compostos fenólicos (CF).....	26
2.3	<i>Avaliação de bioatividade de extratos vegetais.....</i>	30
2.3.1	Polifenóis totais.....	30
2.3.2	Atividade antioxidante.....	31
2.4	<i>Métodos de extração.....</i>	34
2.4.1	Extração soxhlet (ES).....	39
2.4.2	Extração por infusão (EI).....	41
2.4.3	Extração assistida por ultrassom (EU).....	41
2.4.4	Extração com água subcrítica (EASUB).....	43
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1	<i>Obtenção e tratamento do material vegetal.....</i>	46
3.2	<i>Reagentes.....</i>	46
3.3	<i>Extração de compostos da graviola obtidos por soxhlet (ES).....</i>	46
3.4	<i>Extração de compostos de graviola por infusão (EI).....</i>	47
3.5	<i>Extração de compostos da graviola utilizando ultrassom (EU).....</i>	47
3.6	<i>Extração de compostos de graviola com água subcrítica (EASUB).....</i>	48
3.7	<i>Análises realizadas com os extratos das sementes de graviola.....</i>	49
3.7.1	Análise por cromatografia em camada delgada (CCD).....	50
3.7.2	Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	50
3.8	<i>Análises realizadas com os extratos das folhas de graviola.....</i>	51
3.8.1	Quantificação de polifenóis totais (PFT).....	51
3.8.2	Atividade antioxidante total (AAT) pelo método DPPH.....	51

3.8.3	Atividade antioxidante total pelo método ABTS.....	52
3.8.4	Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	53
3.8.5	Planejamento fatorial.....	53
3.8.6	Análise estatística.....	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1	<i>Extratos obtidos a partir das sementes de graviola.....</i>	<i>55</i>
4.2	<i>Extratos obtidos a partir das folhas de graviola.....</i>	<i>59</i>
4.2.1	Quantificação de polifenóis totais (PFT).....	59
4.2.2	Resultados das análises de AAT.....	63
4.2.3	Resultados das análises por CLAE.....	64
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	73
5.1	<i>Conclusões.....</i>	<i>73</i>
5.2	<i>Sugestões para trabalhos futuros.....</i>	<i>73</i>
	REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

A fruticultura é um dos setores de maior destaque do agronegócio brasileiro devido à grande variedade de culturas produzidas em todo o país e em diversos climas. O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas no mundo, ficando atrás apenas de China e Índia, o que mostra a relevância do setor para a economia brasileira. A fruticultura conquista resultados expressivos e gera oportunidades para os pequenos produtores em todo o Brasil (BRASIL, 2015).

Apesar da produção brasileira ter diminuído nos últimos anos em função das condições climáticas desfavoráveis, o volume da produção de frutas frescas atingiu cerca de 44,3 milhões de toneladas em 2015 e 43,8 milhões de toneladas em 2016 (CARVALHO *et al.*, 2017).

Dentre as frutas com grande aceitação e produção na região Nordeste do Brasil (principalmente nos estados da Bahia, Ceará e Pernambuco), destaca-se a graviola (*Annona muricata*), pertencente à família *Annonaceae*. A fruta é utilizada na fabricação de sucos, polpas, sorvetes, compotas, geleias e doces. Além do fruto, a semente, a casca, as folhas e as raízes são usadas geralmente na medicina natural (CORIA-TÉLLEZ *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2016). À receita gerada pela cadeia produtiva da graviola também podem ser somadas as vendas de folhas e sementes, que também têm grandes demandas (PASSOS, 2017).

O consumo e comercialização de polpa de frutas vêm aumentando significativamente a cada ano e o motivo desse aumento deve-se principalmente pela procura de produtos mais saudáveis e práticos para o consumidor (COSTA; CARDOSO; SILVA, 2013).

Na indústria de polpas (sucos) ocorre a geração de resíduos constituídos basicamente de cascas e sementes. Uma das formas de estimular a exploração sustentável é a agregação de valor à cadeia produtiva através do aproveitamento de resíduos para a obtenção de produtos com alto valor de mercado, que podem englobar os compostos bioativos, como os compostos fenólicos, tocoferóis, fitoesteróis, terpenos, entre outros (FORNARI *et al.*, 2012). Geralmente, o processo de obtenção de bioativos de matrizes vegetais envolve uma série de etapas, pelo meio das quais se realiza a separação das substâncias de interesse. Convencionalmente, as técnicas de extração e fracionamento de extratos vegetais apresentam pontos desfavoráveis, como o uso de elevadas temperaturas, longo tempo de extração, grande quantidade de solvente utilizado, presença de

resíduos tóxicos no produto final e a possibilidade de contaminação ambiental (SODEIFIAN; SAJADIAN; ARDESTANI, 2016).

A extração com fluidos subcríticos tem sido amplamente estudada no âmbito da valorização dos resíduos e de produtos secundários oriundos de processos industriais. Podem-se citar, como exemplos encontrados na literatura, trabalhos com tomate (NOBRE *et al.*, 2009), damasco (MEZZOMO *et al.*, 2010), abóbora (HRABOVSKI *et al.*, 2012), casca de eucalipto (DOMINGUES *et al.*, 2013) e café (BARBOSA, 2014). A água tem sido estudada devido ao baixo custo e às propriedades específicas para processos de extração, hidrotermais e oxidativos, em que pode atuar como um solvente menos tóxico que os solventes orgânicos.

Diante do exposto, ressalta-se a importância econômica e ambiental deste trabalho que vem a contribuir para formas sustentáveis de agregação de valor às cadeias produtivas agroindustriais, além, é claro, de fornecer novas fontes de renda aos produtores.

1.1 Objetivo geral

Obtenção de compostos bioativos de extratos oriundos de sementes e folhas de graviola (*Annona muricata*) por diferentes métodos de extração.

1.2 Objetivos específicos

- Avaliar e comparar os extratos obtidos a partir de sementes e folhas de graviola utilizando processo a altas pressões (água subcrítica) e métodos convencionais de extração a baixa pressão (Soxhlet, infusão e ultrassom);
- Quantificar os polifenóis totais nos extratos de folhas de graviola pelo método de Folin-Ciocalteu;
- Avaliar o processo de extração de polifenóis totais de folhas de graviola com água subcrítica através de planejamento fatorial, variando a massa de matéria-prima, temperatura e pressão;
- Analisar as atividades antioxidantes totais dos extratos obtidos de folhas de graviola pelos métodos DPPH e ABTS para todos os métodos de extração avaliados.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Nesta Seção serão abordados tópicos sobre a fruta graviola (matéria-prima deste trabalho), os métodos de extração avaliados e os compostos presentes nos extratos obtidos, assim como aspectos pertinentes relacionados a determinações de polifenóis totais e atividades antioxidantes de extratos vegetais.

2.1 A graviola (*Annona muricata*)

A fruta da planta *Annona muricata* é conhecida como “soursop” (inglês), graviola (português), “guanábana” (espanhol latino-americano) e outros nomes indígenas locais (WATSON; PREEDY, 2010; CORIA-TÉLLEZ *et al.*, 2018) em alguns países. Trata-se de uma planta de clima tropical, cujas características alimentares, cor, sabor e aroma são considerados agradáveis. É cultivada na Venezuela, Porto Rico e Costa Rica. No Brasil é encontrada principalmente nas regiões Norte e Nordeste, sendo seus frutos utilizados na fabricação de suco, sorvetes, compotas, geleias e doces (SILVA; ANTUNES; CATÃO, 2011; SUN *et al.*, 2016).

A graviola (Figura 1) pertence a um importante grupo de plantas frutíferas, que possui a seguinte classificação taxonômica: reino vegetal, divisão angiosperma, classe dicotiledônea, ordem Magnoliales, família Annonaceae, subfamília Annonoideae, gênero *Annona* e espécie *muricata* L. (SILVA; ANTUNES; CATÃO, 2011; SILVA; NEPOMUCENO, 2011; GEORGE *et al.*, 2015). O gênero *Annona* abrange mais de 70 espécies e a espécie *muricata* é a mais amplamente cultivada (CORIA-TÉLLEZ *et al.*, 2018).

Figura 1- Graviola (*Annona muricata*)



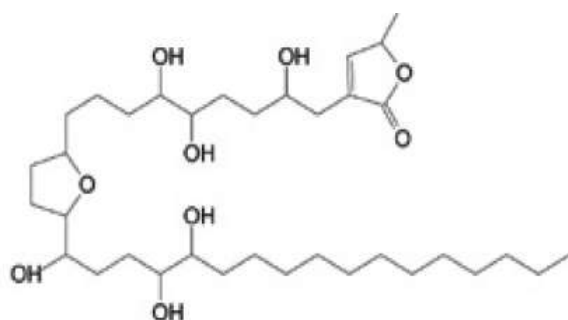
Fonte: SILVA; NEPOMUCENO (2011).

Os frutos da família Annonaceae possuem pseudocarpo formado pela fusão dos carpelos e receptáculos dentro de uma massa carnosa. O seu formato é variável, indo de esferoide à ovoide (em torno de 10-30 cm de comprimento e 20 cm de diâmetro) e a superfície do fruto é coberta com auréolas em forma de “U”, que podem ser suaves ou pontudas. Os frutos quando maduros pesam, em média, de 750 a 2000 g, sendo constituídos de 64-68% de polpa, 20-30% casca e 4-8% de sementes (CRUZ, 2011; PREEDY; WATSON; PATEL, 2011).

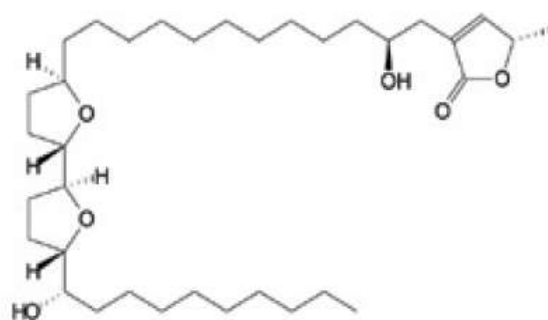
De acordo com Coria-Téllez *et al.* (2018), no fruto da graviola são encontrados duzentos e doze compostos bioativos, dentre os quais citam-se as acetogeninas (ACGs), seguidas de alcaloides, fenóis e outros compostos (açúcares, taninos, ácido ascórbico, pectinas, vitaminas A e do complexo B, amidas e ciclopeptídeos). Silva, Antunes e Catão (2011) afirmam que as folhas de *A. muricata* contêm até 1,8% de óleo essencial rico em β -cariofileno, γ -cadineno e α -elemeno, enquanto as sementes contêm o ciclopeptídeo anomuricatina A e diversas acetogeninas. As acetogeninas são encontradas também nas raízes, folhas e cascas, e são tidas como farmacologicamente ativas contra células tumorais, além de outras ações inibitórias.

Algumas estruturas químicas de ACGs farmacologicamente ativas são apresentadas na Figura 2. As ACGs constituem uma classe de produtos naturais isolados exclusivamente de espécies da família Annonaceae e estão presentes em praticamente todas as partes de plantas dos gêneros *Annona*, *Asimina*, *Uvaria*, *Rollinia* e *Goniothalamus*. Após três décadas de pesquisa, os números de ACGs isoladas nesta família já ultrapassam 500. Em termos biossintéticos, as ACGs são derivadas de ácidos graxos de cadeia longa, sendo aparentemente de origem policetídica. Embora o mecanismo de síntese das ACGs ainda seja desconhecido, a análise retrossintética de compostos conhecidos revela que as mesmas são biossintetizadas através de combinações lineares de duas ou três unidades de carbonos via acetil Co-A e malonil-CoA (PAES *et al.*, 2016). Na Tabela 1 estão listados alguns compostos bioativos isolados da graviola.

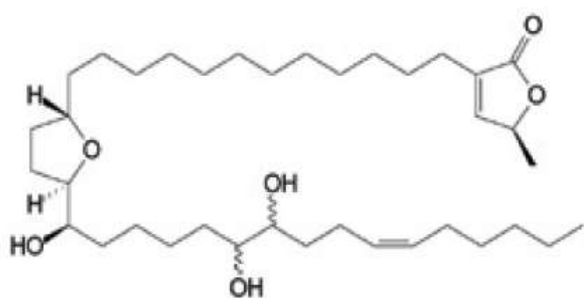
Figura 2- Acetogeninas que apresentam atividade farmacológica.



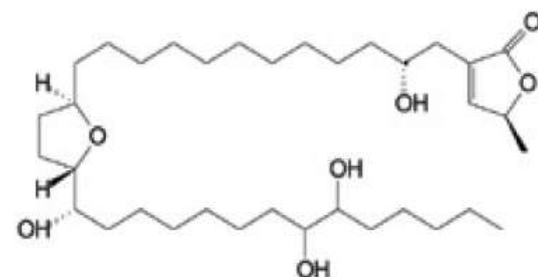
Muricoreacina



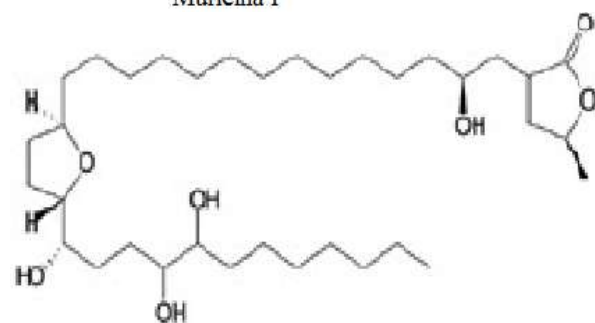
Anocatacina A



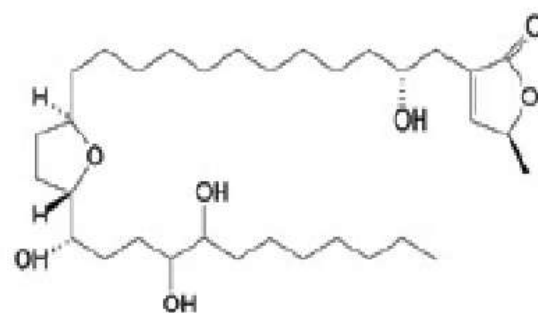
Muricina I



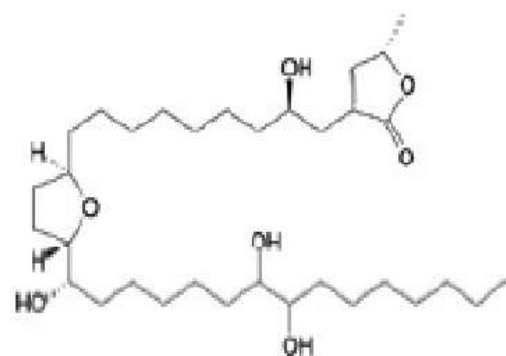
Muricina A



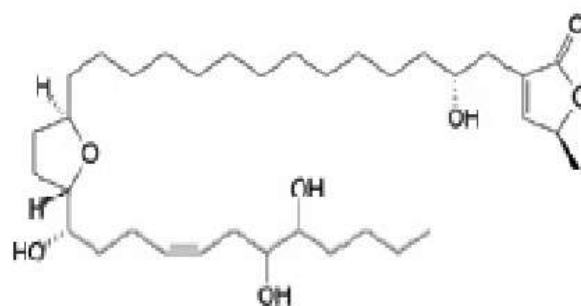
Muricina C



Muricina D



Muricina E



Muricina F

Fonte: Barata *et al.*, 2009.

Tabela 1. Compostos bioativos isolados de *Annona muricata*.

Nome químico	Parte da planta	Bioatividade	Referências
Alcaloides			
Anonaina	Fruto e folha	Antidepressivo, antiplasmódio, inibidor dopamina, citotóxico	Hasrat <i>et al.</i> (1997), Fofana <i>et al.</i> (2011)
Asimilobina	Fruto e folha	Antidepressivo, citotóxico	Hasrat <i>et al.</i> (1997), Fofana <i>et al.</i> (2012)
Anomuricina	Raiz e pele	Não reportado	Leboeuf <i>et al.</i> (1981)
Coreximina		Neurotóxico	
Isoboldina	Folha	Antimalárico	Fofana <i>et al.</i> (2012)
N-metilcoclaurina		Não reportado	
Remerina		Não reportado	
Casuarina	Folha/haste	Não reportado	Mohanty <i>et al.</i> (2008)
Swainsonina		E.R.I*	
Acetogeninas			
Annonacina	Folha, raiz, semente e polpa	Citotóxico, inseticida, antimicrobiano, antitumoral, neurotóxico, neurodegenerativo	Castillo-Sánchez; Jiménez-Osornio; Delgado-Herrera (2010) e Ko <i>et al.</i> (2011)
Annomurinic-D-ona Annopentocina A, B, C Gigantetrocina B Muricoreacina Muricoreania A, B Murihexocina	Folha	Citotóxico	Alali; Xiao-Xi; McLaughlin (1999)

Tabela 1. Compostos bioativos isolados de *Annona muricata*.

(Continuação)

Nome químico	Parte da planta	Bioatividade	Referências
Esquamocina	Semente	Citotóxico e inseticida	Nakanishi <i>et al.</i> (2003)
Annoreticuin-9-ona	Semente	Citotóxico	Ragasa <i>et al.</i> (2012)
Annoreticuina, cis	Polpa		
Muricina J, K, L	Fruta	Citotóxico	Sun <i>et al.</i> (2014)
Muricina M, N	Polpa		
Fenóis			
Emodina Ácido cinâmico Ácido isoferúlico Daidzeína Galocatequina Genisteína Gliciteína tangeretina	Folha	Não reportado	George <i>et al.</i> (2015)
Argentinina Catequina Epicatequina Quercetina Kaempferol	Folha	Antioxidante	Nawwar <i>et al.</i> (2012)
Ácido gálico	Folha	Inibidor	George <i>et al.</i> (2012) e Nawwar <i>et al.</i> (2012)
Outros compostos			
Vitamina E Carotenos α , β Licopeno Luteína Tocoferol α	Polpa	Antioxidante	Correa-Gordillo <i>et al.</i> (2012)

E.R.I.* = Estimula a resposta imune

Fonte: Adaptado de Coria-Téllez *et al.* (2018)

Com relação aos alcaloides, sabe-se que são substâncias orgânicas, de origem natural, cíclicas, contendo um átomo de nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos. Na Família Annonaceae é relatada a predominância de alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos dentre os metabólitos secundários isolados (BARRETO, 2014). Entre as décadas de 1960 e 1980 foram referenciados cerca de 170 alcaloides isolados de diversos gêneros de Annonaceae, sendo mais comum os do tipo benziltetraidroisoquinolínico, com a reticulina em maior ocorrência (LUNA, 2006).

Em pesquisas realizadas na literatura, Barata *et al.* (2009) relataram que a graviola é rica em compostos bioativos (distribuídos por toda a planta, a citar: raiz, caule, folha, semente, casca e polpa) que apresentam atividades antitumoral, antifúngica, antiviral e de inibição de enzimas, cujas funções estão intimamente relacionadas com a conformação molecular destes ciclopeptídeos. Além dessas, outras atividades como antibacteriana, antiparasitária, antiespasmódica, citotóxica, hipotensiva, vasodilatadora, imunossupressora e pesticida, também são relatadas.

De uma forma geral, todas as partes da planta são utilizadas na medicina popular: as sementes são consideradas adstringentes, eméticas, com atividade antiparasitária, moluscicida e antiviral no tratamento de *Herpes simplex*. Ao mesmo tempo, atribuem-se às cascas ação antidiabética e espasmolítica. O suco da fruta é usado em bochechos no combate às aftas, internamente como antitérmico, diurético e no combate de insônias leves. A infusão das folhas secas é usada contra insônias graves, dores de cabeça e como emagrecedor. O decocto das folhas contém óleo essencial com ação parasiticida, antirreumática e antinevrálgica (PREEDY; WATSON; PATEL, 2011; SILVA; ANTUNES; CATÃO, 2011; GEORGE *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2016).

A Tabela 2 resume alguns trabalhos encontrados na literatura que relataram a presença de compostos fenólicos em exemplares de *A. muricata*. Determinaram também a quantidade de polifenóis totais (PFT) e atividade antioxidante total (AAT) através dos métodos DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e ABTS - 2,2-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico (essas metodologias são descritas na Seção 3.7). Além disso, a Tabela 2 apresenta também os métodos de extração e os solventes utilizados.

Tabela 2. Extrações realizadas segundo a literatura à base de partes de *A. muricata* L. na obtenção de polifenóis totais (PFT) e atividades antioxidantes totais (AAT).

Espécie	Parte	Método	Solvente	PFT	AAT	Referência
<i>A. muricata</i> L.	Polpa	Maceração	Etanol e água	84,3 mg AG/100 g	DPPH - 2,88 $\mu\text{mol Trolox/g}$ ABTS - 4,8 $\mu\text{mol Trolox/g}$	Kuskoski <i>et al.</i> (2005)
<i>A. muricata</i> L.	Folha	Ultrassom	Etanol e água	54,6 mg AG/g		
<i>A. muricata</i> L.	Folha	Alta pressão	Metanol	100,3 mg AG/g		
<i>A. muricata</i> L.	Folha	Alta pressão	Etanol	93,2 mg AG/g	ABTS - 348,5 $\mu\text{mol Trolox/g}$	Moraes <i>et al.</i> (2016)
<i>A. muricata</i> L.	Folha	Cocção	Água	33,0 mg AG/g		
<i>A. muricata</i> L.			Água	18,6 mg AG/100 g	DPPH - 978,09 $\mu\text{g/mL}$ ABTS - 115 $\mu\text{M/g}$	
	Polpa	Maceração			DPPH - 616,37 $\mu\text{g/mL}$	Sousa <i>et al.</i> (2011)
<i>A. muricata</i> L.			Etanol e água	24,1 mg AG/100 g	ABTS – 136,0 $\mu\text{M/g}$	
<i>A. muricata</i> Crioula				188,5 mg AG/100 g	DPPH - 156,40 g/g	
<i>A. muricata</i> Lisa	Polpa	Maceração	Hidroacetona e Hidrometanol	358,9 mg AG/100 g	DPPH - 179,25 g/g	Siqueira <i>et al.</i> (2015)
<i>A. muricata</i> Morada				264,6 mg AG/100 g	DPPH - 212,08 g/g	

AG – equivalente à ácido gálico.

Como foi mencionando, a graviola é uma fruta típica que é processada industrialmente. O despulpamento pode ser realizado manualmente ou por despulpadeira (SILVA; ANTUNES;

CATÃO, 2011). Em geral, os resíduos industriais do processamento de frutas são uma fonte de biomassa e estes resíduos alimentares são constituídos tipicamente por 50-75% de carboidratos (celulose e hemicelulose), 5-25% de lignina e quantidades modestas de outras substâncias, incluindo compostos fenólicos, lipídeos e compostos ácidos, dependendo da matéria-prima trabalhada. Assim sendo, a importância em estudar o potencial de resíduos agroindustriais, como sementes e folhas de graviola, pode agregar um maior valor para a sua cadeia produtiva (MAYANGA-TORRES *et al.*, 2017).

2.2 Compostos bioativos

As plantas superiores (gimnospermas e angiospermas) constituem uma das fontes mais importantes de novas substâncias utilizadas diretamente como agentes medicinais. Para sobreviver e evoluir, os vegetais devem competir por espaço e se defender do ataque de herbívoros e patógenos; devido a este impasse, as plantas desenvolveram suas próprias defesas químicas. Esta é uma das razões pelas quais a constituição química das plantas é tão complexa (BARRETO, 2014).

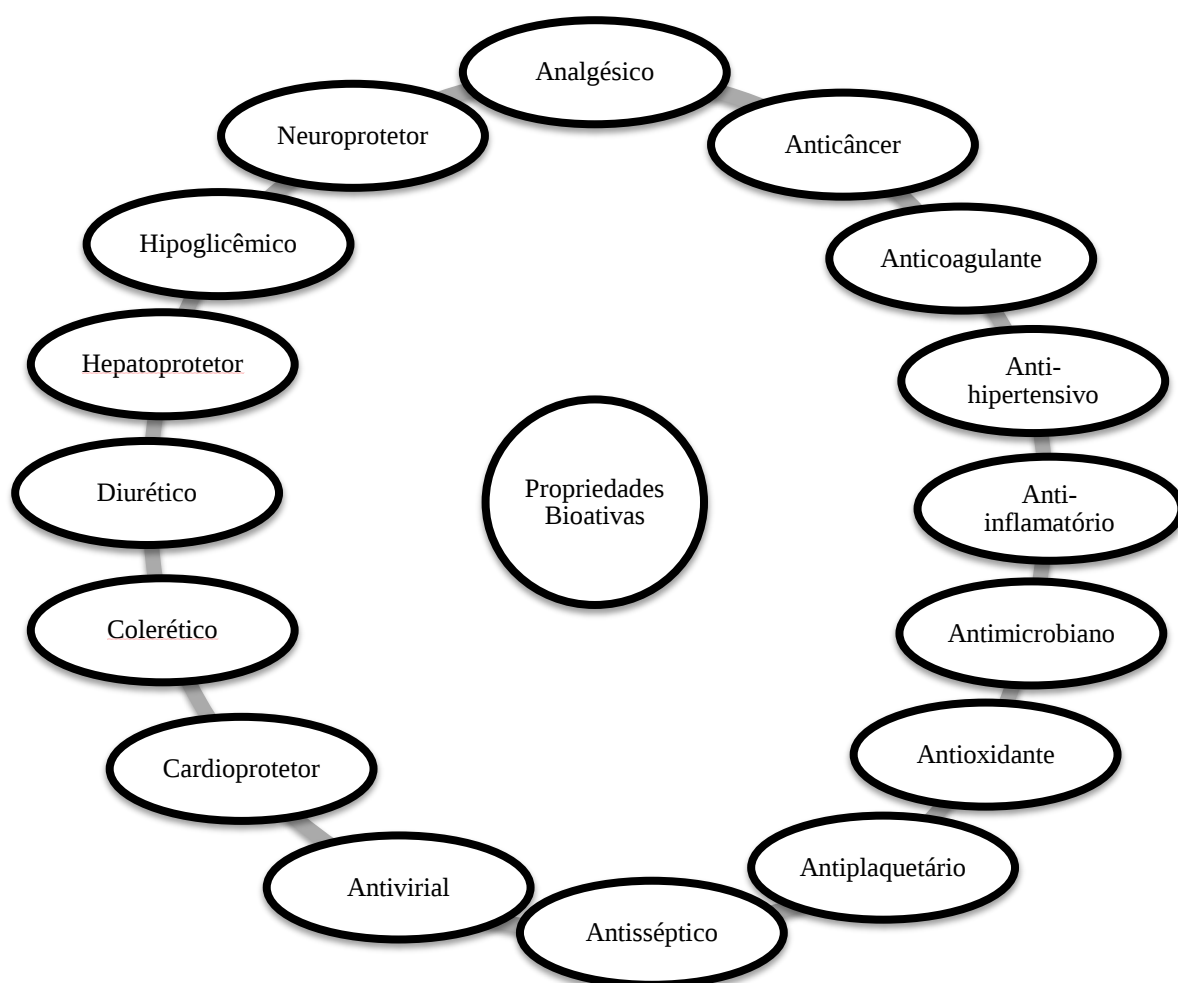
Tendo em mente esses conceitos, pode-se definir um composto bioativo como um produto isolado ou purificado, derivado de plantas, frutas, especiarias e cereais, comercializado em diversas formas medicinais. O composto bioativo apresenta efeitos benéficos ou promove proteção ao vegetal; além disso, pode apresentar atividades biológicas diversas importantes à saúde humana (SILVA, 2008).

Os compostos bioativos oriundos de plantas são influenciados por diversos fatores, tais como fatores genéticos, fisiológicos e evolutivos, condições ambientais, variações geográficas e tempo de colheita (SODEIFIAN; SAJADIAN; ARDESTANI, 2016). Essas substâncias recebem também a denominação de metabólitos secundários, uma vez que são produzidas pelos vegetais de acordo com determinadas situações de estresse biótico ou abiótico, como por exemplo, metabólitos contra a radiação ultravioleta ou agressões de insetos ou patógenos (SILVA, 2008; BASTOS; ROGERO; AREAS, 2009).

De acordo com Toldrá (2017), existe um consenso geral sobre os benefícios reais dos fitoquímicos derivados de plantas amplamente utilizados desde a antiguidade para várias condições orgânicas/clínicas. No entanto, as sociedades primitivas não conheciam os

componentes bioativos reais responsáveis por suas propriedades preventivas, de melhoria da saúde e até curativas. Devido à curiosidade humana, foi criada uma área de pesquisa, a fitoquímica, que busca estudar os produtos decorrentes do metabolismo secundário dos vegetais e compreende as etapas de isolamento, purificação e determinação estrutural desses metabólitos. Quando associada a ensaios específicos de atividade biológica, a análise fitoquímica permite identificar, analisar e caracterizar frações ou substâncias bioativas presentes em uma determinada espécie, salientando que nos extratos brutos os constituintes ativos estão normalmente presentes em pequenas concentrações (LUNA, 2006). Continuamente são realizados estudos altamente específicos, seletivos e detalhados para confirmar e até mesmo determinar os mecanismos de ação efetivos de compostos com atividades biológicas. A Figura 3 apresenta as principais funções dos compostos bioativos.

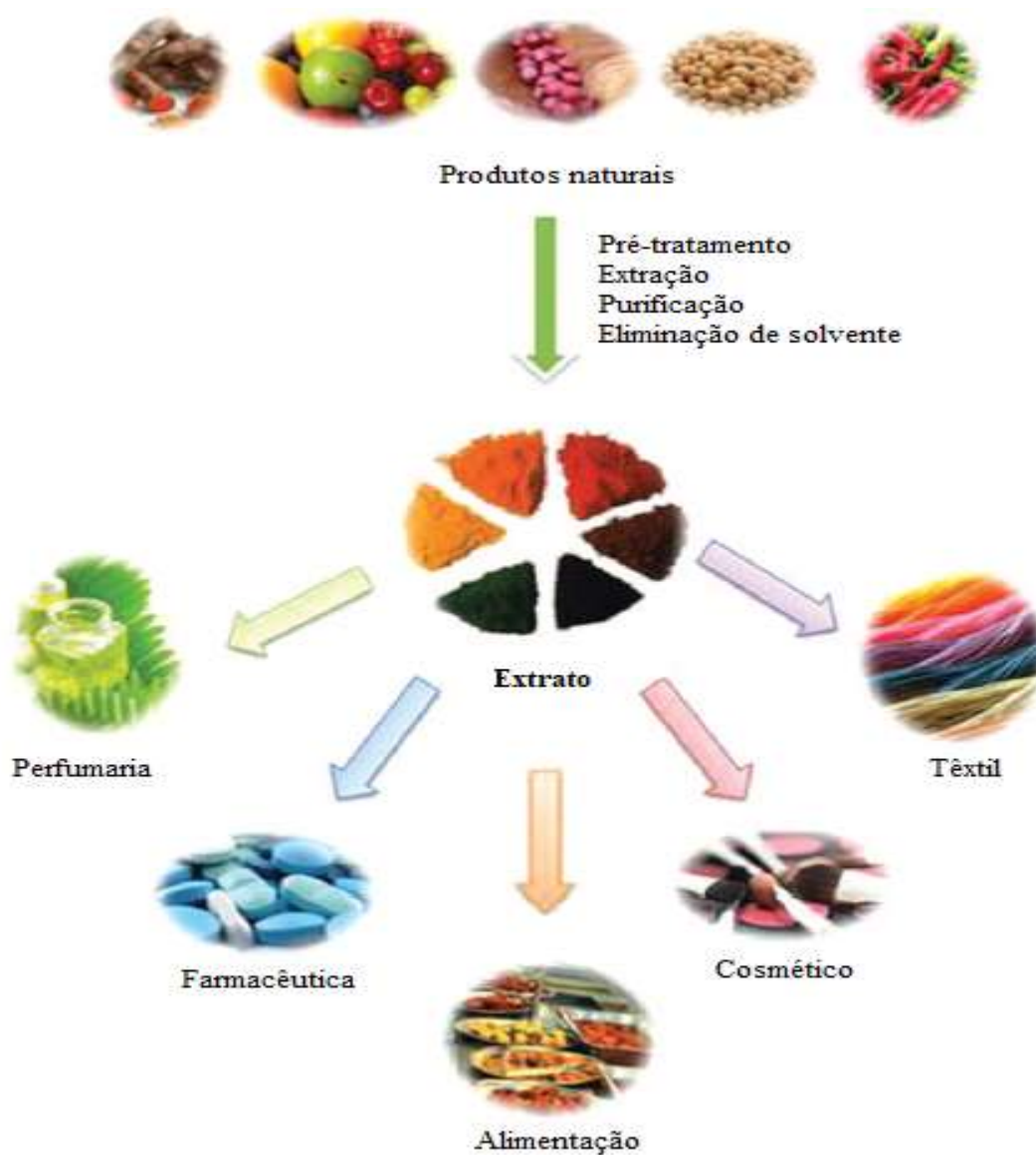
Figura 3- Múltiplos benefícios para a saúde através do consumo de fontes ricas de compostos bioativos.



Fonte: Adaptado de Toldrá (2017)

Como já relatado, a evidência científica sobre os benefícios fisiológicos, nutricionais e medicinais para a saúde humana, bem como os potenciais efeitos nocivos do uso de produtos sintéticos e consequentes ações legislativas que restringem seu uso, motivaram um aumento significativo no consumo de produtos naturais. Nesse contexto, os extratos de fontes naturais desempenham um papel importante como aditivos naturais ou insumos industriais para indústrias alimentares, cosméticas, têxteis, de perfumaria e farmacêuticas (Figura 4) (ROSTAGNO; PRADO, 2013).

Figura 4- Usos e aplicações de extratos de fontes naturais.



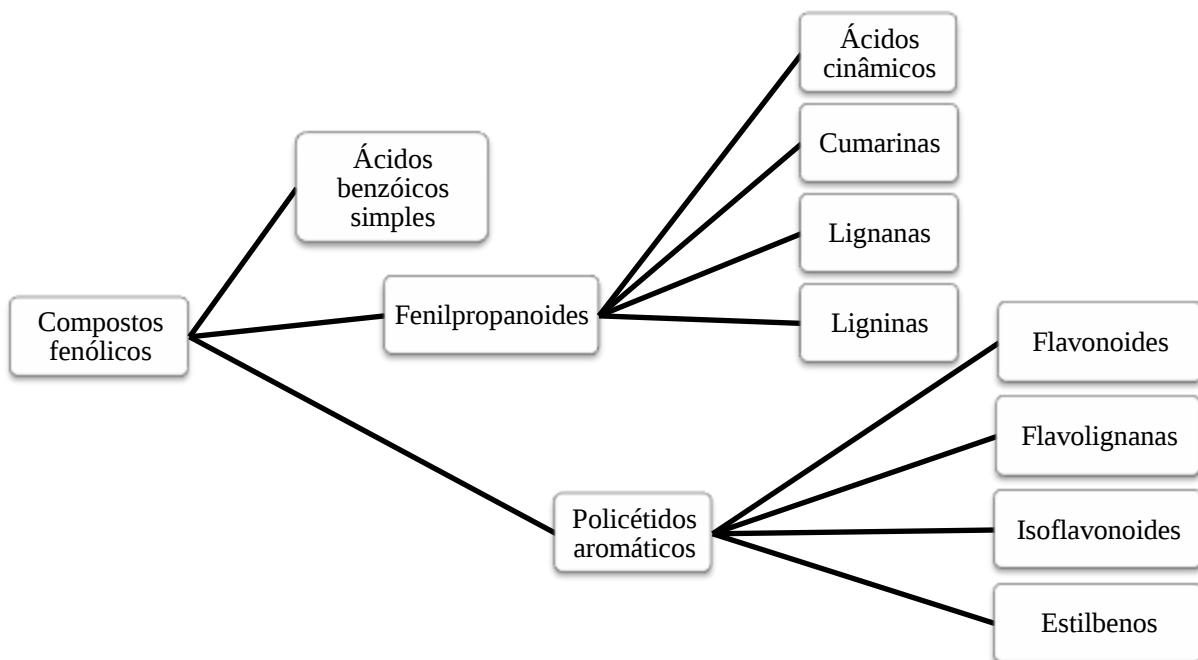
Fonte: ROSTAGNO; PRADO (2013).

2.2.1 Compostos fenólicos (CFs)

Os compostos fenólicos abrangem um grupo diverso de substâncias químicas. Cerca de 40% são oriundos da via do acetato-malonato e os outros 60% são originados da via do ácido chiquímico, e possuem uma característica em comum: a presença de pelo menos um anel aromático ligado ao grupamento hidroxila (SANTOS, 2015). Os CFs são largamente distribuídos na natureza e apresentam um comportamento não uniforme durante o desenvolvimento da hortaliça ou da fruta em resposta aos fatores externos. A síntese desses compostos, além do componente genético e do estágio de desenvolvimento, é influenciada por diversos fatores ambientais como a disponibilidade de nutrientes, a temperatura e, em particular, a luz (SILVA, 2008).

Dessa forma, a definição mais recente, de acordo com Toldrá (2017), cita os ácidos benzoicos sendo produzidos primeiramente. Tais compostos apresentam a estrutura mais simples (Figura 5). Já os derivados de fenilpropanoides têm suas bases de unidades de fenilpropano (oriundos do C_6-C_3), dos quais os ácidos cinâmicos e seus ésteres, lignanas e ligninas, ácidos benzoicos e cumarinas representam as classes de compostos fenólicos mais representativos. Finalmente, os flavonoides e isoflavonoides, estilbenos e flavonolignanas representam os principais fenólicos originados dos policétidos aromáticos. Devido às suas estruturas complexas, os flavonoides, como antocianinas e taninos, são considerados metabólitos mistos derivados das vias de chiquimato e poliacetato.

Figura 5- Esquema representativo da biossíntese dos compostos fenólicos (via chiquimato).



Fonte: Adaptado de Toldrá (2017).

A respeito dos não flavonoides, estes são catalogados como derivados das estruturas químicas C_6-C_1 (ácidos hidroxibenzóico, gálico e elágico); resultados das composições químicas C_6-C_3 específicas dos ácidos cafeico e p-cumárico hidroxicinamatos; e os derivados de estruturas químicas $C_6-C_3-C_6$. Os flavonoides apresentam a estrutura química $C_6-C_3-C_6$, compostos no mínimo por dois anéis aromáticos (SANTOS, 2015). Uma breve descrição de cada classe de compostos fenólicos é apresentada na Tabela 3, enquanto na Figura 6, estão expressos os esqueletos básicos dos CFs.

Tabela 3. Principais classes de compostos fenólicos e características químicas.

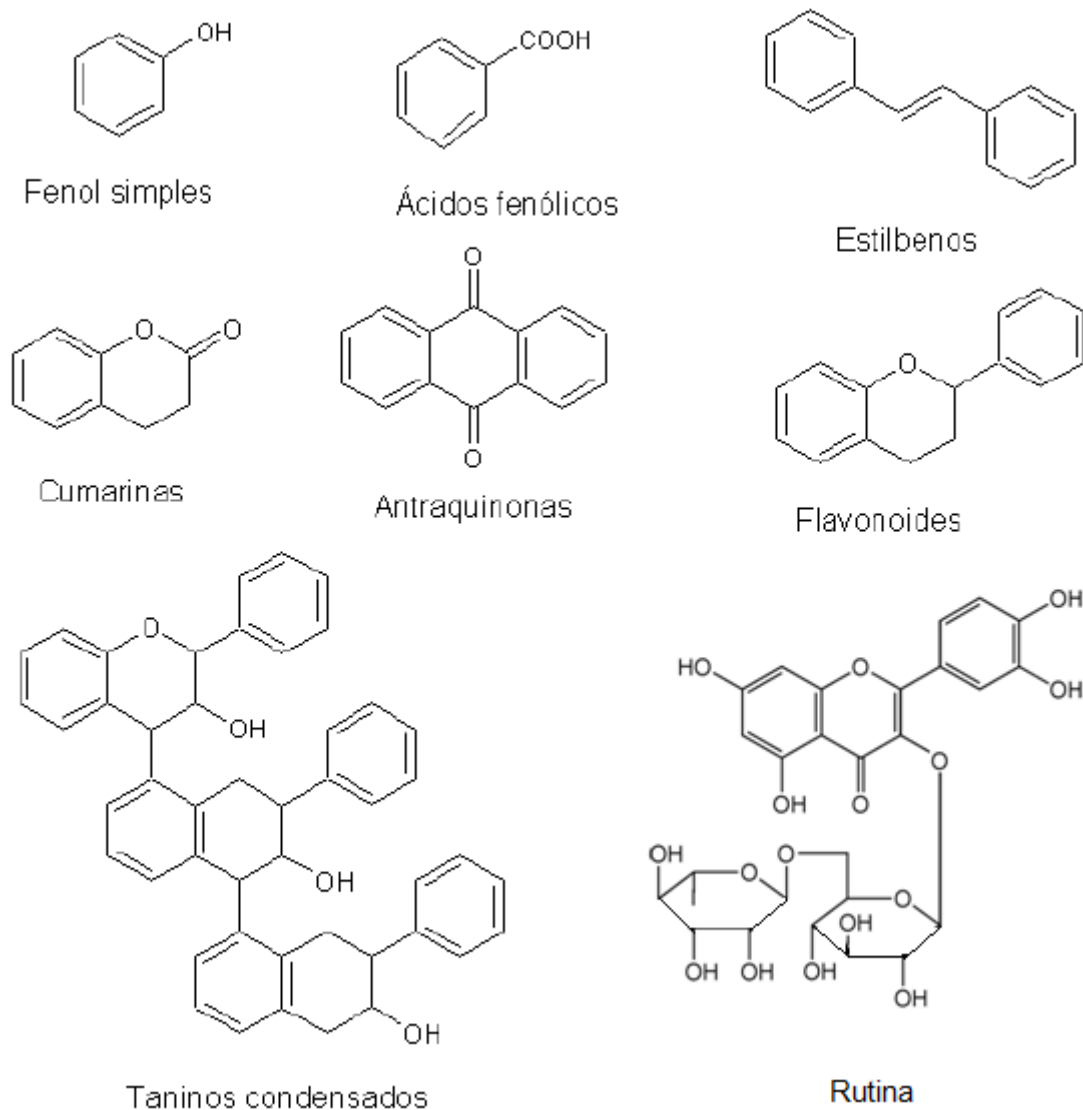
Classes de compostos fenólicos	Descrição	Exemplo
Flavonoides	Constituintes fenólicos com maior abundância no reino vegetal. São compostos polifenólicos derivados de calconas (formados pela junção de dois anéis aromáticos com um sistema carbônico α , β -insaturado de três carbonos) com estruturas complexas, um esqueleto $C_6-C_3-C_6$ derivado das vias chiquimato e acetato. Possuem três anéis aromáticos com quinze carbonos: um anel de benzeno, condensado com um anel de seis membros e um fenil benzeno na posição 2, como substituintes. Os flavonoides ocorrem principalmente nas folhas e na pele das frutas, exibindo inúmeros benefícios. Eles também se associam a açúcares, sendo comumente distinguidas seis subclasses diferentes de flavonoides: antocianinas, isoflavonas, flavanóis, flavanonas, flavonas e flavonóis	Antocianina: cianidina Isoflavonas: genisteína Flavanóis: catequina Flavanonas: hesperidina Flavonas: apigerina Flavonóis: quercetina Calconas: floretina
Ácidos hidroxibenzóicos	CFs amplamente distribuídos no reino vegetal, possuindo moléculas de sete carbonos com um esqueleto C_6-C_1 . Os taninos também fazem parte deste grupo, variando de pequenas a grandes moléculas. Podem distinguir-se duas classes principais de taninos hidrolisáveis (possuindo taninos centrais de álcool polihídrico e glicose e grupos hidroxilo-esterificados ou não por ácido gálico) e não hidrolisáveis (estruturas mais complexas, resultantes da polimerização de alguns flavonoides)	Ácido gálico
Ácidos hidroxicinâmicos	Grupo de componentes fenólicos derivados dos ácidos cinâmicos: exibem um esqueleto C_6-C_3 constituído por ácido transfenil-3-propenóico e um ou mais grupos hidroxila, com alguns deles metilados	Ácido cafeico
Cumarina	Substâncias fenólicas derivadas de ácidos fenólicos formados por fusão de um anel de benzeno com um heterociclo de oxigênio. Mais de 1000 cumarinas diferentes ocorrem em plantas superiores, principalmente em raízes e sementes, mas também podem ser encontradas em diferentes órgãos de plantas	Esculetina

Tabela 3. Principais classes de compostos fenólicos e características químicas. (Continuação)

Classes de compostos fenólicos	Descrição	Exemplo
Lignanas	Compostos fenólicos comumente encontrados em várias plantas, sendo até quantificados em todos os órgãos, resultantes da união de dois resíduos de ácidos cinâmicos ou seus derivados biogênicos	Enterodiol
Ligninas	CFs com uma estrutura complexa, sendo compostos por vários ramos de três álcoois simples (monolignóis). Compreendem os três polímeros mais abundantes da natureza, também ocorrendo em tecidos vegetais	Guaiacila
Estilbenos	Componentes fenólicos com uma estrutura $C_6-C_2-C_6$ amplamente distribuída em várias espécies de plantas. O resveratrol constitui o estilbeno mais importante e amplamente conhecido, com benefícios à saúde bem conhecidos	Resveratrol
Xantonas	Constituintes fenólicos com uma estrutura $C_6-C_1-C_6$, ocorrendo principalmente em plantas superiores. Sua estrutura heterocíclica é bastante semelhante aos flavonoides, sendo comumente divididas em cinco grupos diferentes: xantonas simples oxigenadas, glicosídeos de xantona, xantonas preniladas, xantonolignóides e outros	Mangostina

Fonte: Adaptado de Toldrá (2017).

Figura 6- Esqueletos básicos de compostos fenólicos.



Fonte: Adaptado de Silva (2008).

2.3 Avaliação de bioatividade de extratos vegetais

2.3.1 Polifenóis totais

A determinação dos fenóis totais, na maior parte dos casos, é realizada pelos métodos espectrofotométricos de Folin-Ciocalteu, Folin-Denis ou do azul da Prússia, que se baseiam em reações de oxidação-redução entre os compostos fenólicos e íons metálicos; todavia, a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu figura entre as mais extensivamente utilizadas (SILVEIRA, 2013).

em frações de segundo e, em seguida, podem entregar seu elétron não pareado ou capturar um elétron de outra molécula a fim de formar um par. De uma forma ou de outra, os radicais acabam ficando estáveis, mas a molécula atacada, em si, transforma-se em um radical. Isso inicia uma reação em cadeia que pode agir destrutivamente sobre um tecido (RUFINO *et al.*, 2007b).

É necessária a existência de métodos rápidos e confiáveis para a determinação da eficiência dos antioxidantes na prevenção de doenças. Devido à complexidade da composição de materiais vegetais, a separação de compostos e o estudo individual de cada substância antioxidante tornam-se praticamente inviáveis em função dos altos custos envolvidos nos processos de fracionamento de tais compostos (SUCUPIRA *et al.*, 2012).

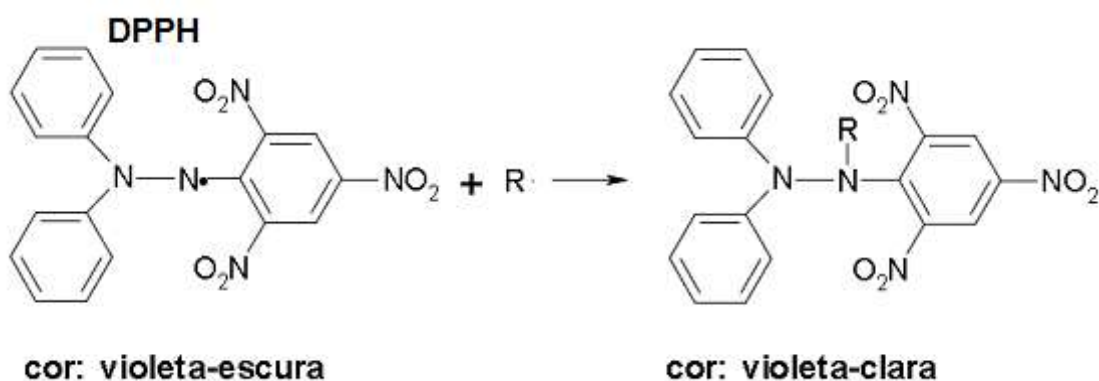
Existem diversas metodologias para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias bioativas, envolvendo a aplicação desde experimentos químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos empregando técnicas instrumentais (ALVES *et al.*, 2010). As principais espécies reativas envolvem moléculas de oxigênio em sua composição, incluindo ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical lipídico ($L^{\bullet}$) entre outros (MAGALHÃES *et al.*, 2008; RUFINO *et al.*, 2007b). Os métodos existentes para identificação de um composto antioxidante podem ser baseados na captura do radical peroxila (“ORAC” - capacidade de absorção de radiação de oxigênio; e “TRAP” - potencial reativo antioxidante total), no sequestro do radical orgânico (DPPH e ABTS), na captura do radical hidroxila (método da desoxirribose), no poder de redução do metal (“FRAP” - poder antioxidante de redução férrica; e “CUPRAC” - capacidade de antioxidante reduzindo íons cúpricos), e na quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídeos (co-oxidação do β -caroteno e oxidação do LDL). Os métodos mais comumente utilizados na avaliação do potencial antioxidante e redutor, principalmente de fontes naturais, são os métodos DPPH e ABTS (SUCUPIRA *et al.*, 2012).

2.3.2.1 Método DPPH

O ensaio DPPH é muito popular em estudos envolvendo produtos naturais por se tratar de um método simples e sensível. O composto foi descoberto por Goldschmidt e Renn em 1922 e é bastante utilizado nas pesquisas envolvendo reações com radicais livres. A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron

desemparelhado por toda a molécula, que pode ser explicada pelo fato de sua estrutura possuir ligações duplas alternadas nos anéis benzênicos, sofrendo assim efeitos de ressonância, muito eficazes na estabilização da carga eletrônica e por dispersá-la por toda molécula. Além disso, os grupos NO_2 no anel picril-hidrazila auxiliam na estabilização do elétron desemparelhado, descentralizando-o, pois são grupos retiradores de elétrons. Esta deslocalização confere a esta molécula uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 520 nm. Este ensaio se baseia na ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar, em reduzir o DPPH formando difenil-picril-hidrazina. Quando ocorre esta doação de átomos de hidrogênio a uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta para amarelo pálido ou violeta clara (TEIXEIRA, 2018). A dissolução do radical DPPH ocorre em meio orgânico (Figura 8).

Figura 8- Estabilização do radical livre DPPH.



Fonte: Rufino *et al.* (2007a).

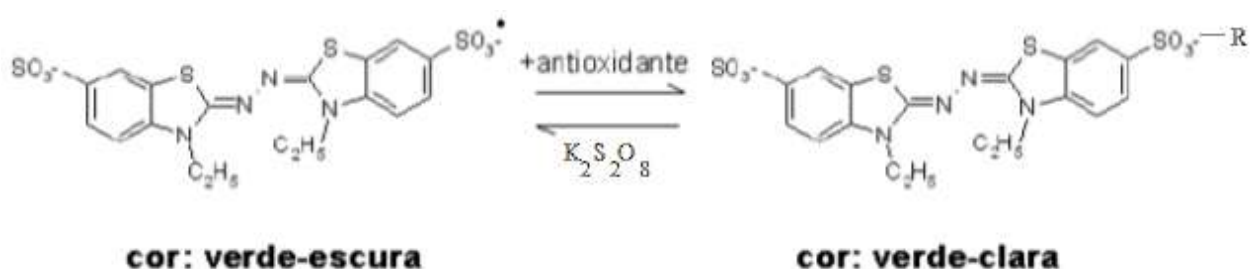
De acordo com Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), a estrutura conformacional dos antioxidantes influencia a reação com o DPPH. Ao caracterizar os intermediários e os produtos de interação, obtém-se uma melhor compreensão dos mecanismos de reação dos substratos, sendo também necessária a separação dos compostos por cromatografia e posterior identificação.

2.3.2.2 Método ABTS

Outro método bastante utilizado é o método ABTS. As diferenças com relação ao método DPPH consistem basicamente na formação do radical utilizado. O DPPH é um radical livre adquirido dessa forma, sem a necessidade de preparo, enquanto o radical ABTS deve ser gerado por reações enzimáticas (metmoglobina ou peroxidase de rábano) ou químicas (usando dióxido

de manganês, 2,2'azobis (2-metilpropionamidina) dihidrocloreto ou persulfato de potássio). Outra diferença consiste no fato de que o radical ABTS pode ser solubilizado em meios orgânicos e aquosos (dependendo da natureza dos compostos) para a determinação da atividade antioxidante, enquanto que o radical DPPH somente pode ser solubilizado em meios orgânicos, especificamente alcoólicos (MAGALHÃES *et al.*, 2008). Na presença de um antioxidante ocorre a redução do ABTS^+ para ABTS, promovendo a perda da coloração do meio reacional, conforme apresentado na Figura 9.

Figura 9- Estabilização do radical ABTS^+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.



Fonte: Rufino *et al.* (2007b)

Assim, o método torna-se aplicável ao estudo de antioxidantes de natureza hidrofílica e lipofílica, compostos puros e extratos vegetais. E baseia-se na formação do ABTS^+ (de cor verde-escura) por meio da reação do ABTS com persulfato de potássio, na faixa de absorção máxima em 645, 734 e 815 nm. Com a extensão da perda de cor, a porcentagem de inibição do ABTS^+ é determinada em função do Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), um padrão submetido às mesmas condições de análise do antioxidante (RUFINO *et al.*, 2007b).

2.4 Métodos de extração

O processo de extração típico, especialmente para materiais vegetais, incorpora diversas etapas, que incluem:

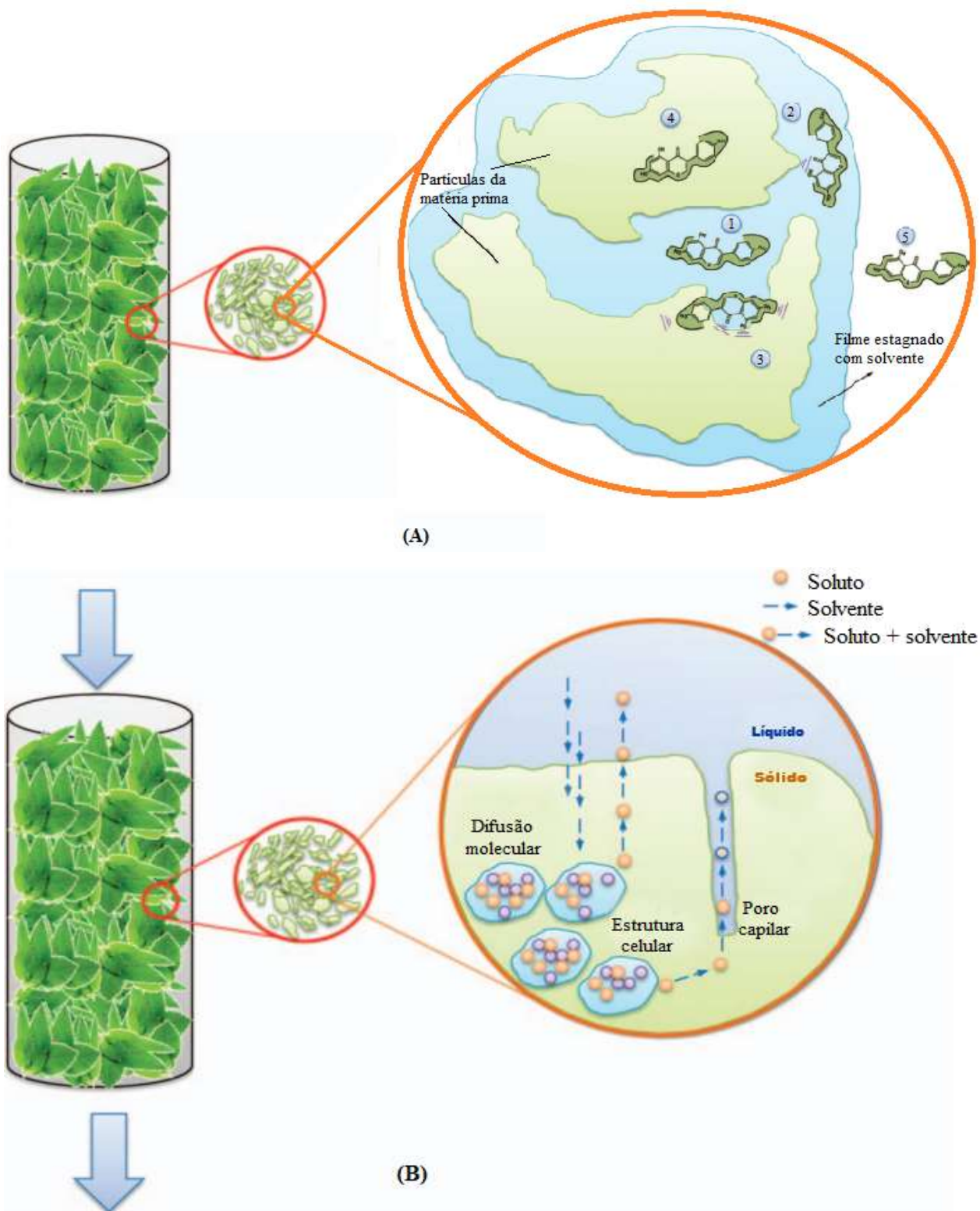
1. Coleta, secagem, moagem e armazenamento do material vegetal, homogeneização de partes de plantas frescas (folhas, flores, etc.) ou infusão de partes vegetais com solvente.
2. Escolha de solventes de acordo com a polaridade dos compostos-chave.
3. Escolha do método de extração adequado:

- | | |
|--------------|---|
| a. Infusão | d. Extração com fluidos sub- ou supercríticos |
| b. Ultrassom | e. Ebulição |
| c. Soxhlet | f. Destilação a vapor |

A operação de extração é um processo, do ponto de vista físico, que tem como princípio a transferência de massa entre um ou mais componentes de uma fase para outra. Tal processo contém várias etapas subsequentes, como segue na Figura 10. Contudo, o processo se inicia com o solvente sendo transferido da fase fluida para a fase sólida, permeando para o interior da partícula sólida pelo mecanismo de difusão molecular; com isso, os elementos solúveis são solubilizados por desorção da matriz vegetal e solvatação no solvente. A partir deste momento, os solutos desejados presentes na solução, são transportados até a superfície da partícula sólida por difusão molecular, e a solução é conduzida da superfície sólida para o seio do fluido através do mecanismo de convecção (ROSTAGNO; PRADO, 2013).

O foco de muitas pesquisas nos dias de hoje são os compostos biologicamente ativos presentes nas plantas. A identificação e o isolamento de novos compostos bioativos a partir de extratos de plantas contribuem de forma significativa para a química de compostos naturais e farmacologia (NASTIC *et al.*, 2018). Tais compostos podem ser encontrados dissolvidos nos poros da matriz e/ou adsorvidos na superfície do poro (1), ser adsorvidos na superfície da matriz (2), dissolvidos/adsorvidos em um micro/nano poro (3) ou nos produtos naturais assumindo que estão quimicamente ligados à matriz (4) e transportados por convecção natural ou forçada (5) (Figura 10). Dependendo da localização do soluto na matriz sólida, o mesmo é mais facilmente acessível ao solvente e extraído por ele. Nas sementes, frutas e raízes, os solutos geralmente são distribuídos uniformemente no sólido, enquanto nas folhas e flores os solutos se encontram no interior de tricomas glandulares frágeis (ROSTAGNO; PRADO, 2013).

Figura 10- (A) Conceitualização de uma matriz natural e os possíveis locais em que pequenas moléculas podem ser encontradas; (B) Esquema do mecanismo de extração.



Fonte: Adaptado de Rostagno e Prado (2013)

Os principais objetivos do processo de extração estão relacionados a uma ou mais propriedades importantes (SARKER; LATIF; GRAY, 2005):

- Elevada seletividade/pureza: o extrato resultante tem uma quantidade baixa de compostos coextraídos interferentes ou indesejáveis;
- Elevada sensibilidade: o extrato resultante permite diferentes técnicas de quantificação que produzem uma alta inclinação nas curvas de calibração;
- Limite de detecção/quantificação: os componentes dos extratos podem ser detectados/quantificados em níveis baixos, porque são obtidos baixos níveis de ruído no sistema analítico;
- Rendimento elevado: os compostos alvos são recuperados exhaustivamente.

Os métodos de extração podem ser divididos em convencionais e não convencionais, variando em função de custos e nível de complexidade. Para a maioria das aplicações, técnicas relativamente simples, como a percolação e a maceração, são efetivas e econômicas. Algumas aplicações específicas, no entanto, exigem técnicas de extração mais sofisticadas e onerosas usando equipamentos especializados, como nos casos de destilação a vapor em grande escala e na extração com fluidos supercríticos (SARKER; LATIF; GRAY, 2005).

Além da técnica de extração, a preparação de amostras é, na maioria das vezes, uma necessidade, pois mesmo as amostras mais simples são frequentemente inadequadas para análise direta devido a fatores como diluição ou concentração excessiva dos analitos alvo ou incompatibilidade com os procedimentos de operação do instrumento (ROSTAGNO; PRADO 2013).

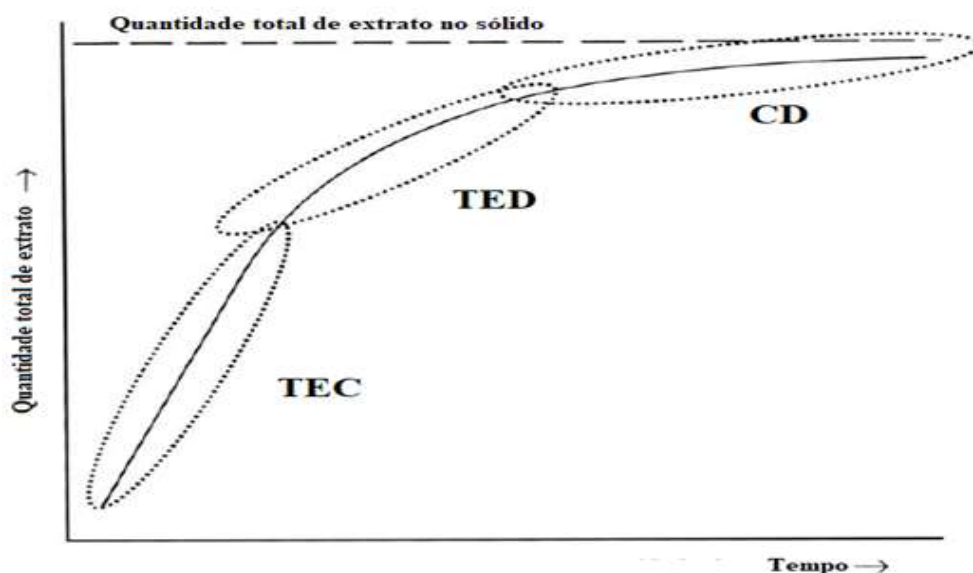
No que diz respeito à escolha do solvente, alguns fatores devem ser considerados na extração de materiais vegetais, principalmente por questões relacionadas à solubilidade dos metabólitos desejados, mas também por parâmetros físicos como viscosidade, tensão superficial e pressão de vapor do solvente (CHEMAT *et al.*, 2017). Além disso, uma revisão cuidadosa da literatura relacionada às espécies e às classes de compostos sob investigação muitas vezes economiza tempo e esforço. Caso exista pouca informação sobre os compostos bioativos de uma determinada espécie, relatórios fitoquímicos sobre outras espécies do gênero ou família podem

fornecer pistas sobre quais classes de compostos são esperados e quais solventes e procedimentos podem ser usados para isolá-los (SARKER; LATIF; GRAY, 2005).

Diversos produtos químicos orgânicos são produzidos em escala industrial por biotransformações, onde a água pode ser usada como meio reacional. As aplicações de solventes hidrofóbicos destacam-se normalmente pela dissolução de compostos hidrofóbicos em meios não aquosos, vias de reação que são impossíveis na água devido a restrições cinéticas ou termodinâmicas e insolubilidade enzimática, que permite a sua fácil recuperação e reutilização. Contudo, o uso de solventes orgânicos pode ser problemático devido à sua toxicidade, inflamabilidade e devido às preocupações ambientais crescentes. Como resultado, os fluidos hidrotérmicos atraíram muita atenção nos últimos anos como alternativa aos solventes orgânicos para reações enzimáticas e de extração (KNEZ, 2018).

O comportamento de transferência de massa exigido para otimização de projetos e processos está relacionado à taxa de soluto transferido das partículas sólidas para a fase fluida (KITZBERGER *et al.*, 2009). Como resultado, os processos de extração geralmente seguem uma curva cinética em base livre de solvente (Figura 11), onde pode-se notar que a taxa de transferência de massa não é constante. As curvas de extração geralmente consistem em três fases distintas: período de taxa de extração constante (TEC), período de taxa de extração decrescente (TED) e período controlado por difusão (CD) (ROSTAGNO; PRADO 2013).

Figura 11- Curva cinética típica observada para a extração de produtos naturais em base livre de solvente.



Fonte: adaptado de Rostagno e Prado (2013).

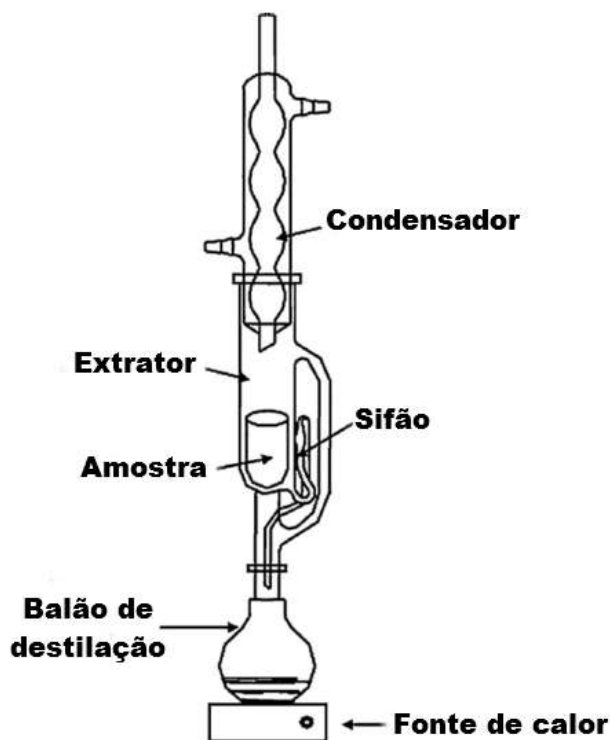
2.4.1 Extração Soxhlet (ES)

O extrator Soxhlet foi inventado por Franz Ritter von Soxhlet em 1879 e fornece uma rota eficiente para liberar analitos retidos em amostras complexas sem mecanização excessiva e esforço manual. Inicialmente, sua aplicação buscava a obtenção de lipídeos presentes no leite. Atualmente, a gama de suas aplicações é extensa. Ao contrário de outros métodos, a ES permite a lixiviação completa de compostos incorporados em matrizes complexas com alíquotas de solvente (CHEN; URBAN, 2015). A Figura 12 mostra um sistema de extração Soxhlet. Em geral, o processo de ES convencional abrange as seguintes etapas:

1. Vaporização do solvente de extração;
2. Condensação de vapores de solvente;
3. Lixiviação de moléculas de analito a partir da amostra pelo solvente condensado;
4. Acumulação de extrato no sifão (canal lateral do coletor extrator);
5. Movimento do tampão de extração para baixo para os frascos de solvente;
6. Repetição dos passos.

Esse método vem sendo utilizado há muito tempo por ser uma técnica padrão de extração que serve para a avaliação de desempenho de métodos mais modernos, superando em desempenho outras técnicas convencionais (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010; WANG; WELLER, 2006). A principal desvantagem do método consiste no constante aquecimento do extrato no ponto de ebulição do solvente utilizado, o que pode degradar compostos termolábeis e/ou iniciar a formação de compostos indesejados (CHEN; URBAN, 2015).

Figura 12- Extrator Soxhlet.



Fonte: Adaptado de Castro e Priego-Capote (2010)

Rostagno e Prado (2013) citam vantagens da ES, na qual a amostra é repetidamente colocada em contato com porções frescas de solvente, o que facilita o deslocamento do equilíbrio de transferência. Além disso, não é necessária a filtração após a lixiviação e a taxa de transferência da amostra pode ser aumentada ao executar várias extrações simultâneas em paralelo, o que é facilitado pelo baixo custo do equipamento básico. Algumas desvantagens são citadas, tais como o tempo necessário para a extração e a grande quantidade de solvente desperdiçado, o que não é apenas dispendioso, mas também a fonte de problemas ambientais adicionais.

Vários sistemas Soxhlet modificados foram projetados em um esforço para superar as desvantagens da técnica clássica. A maioria deles se concentra em acelerar o processo em uma tentativa de reduzir a degradação térmica dos compostos alvo e do consumo de solvente. Algumas alternativas para aumentar a velocidade com que o solvente dissolve os componentes desejados aplicam, por exemplo, micro-ondas ou ultrassom (ROSTAGNO; PRADO, 2013; CHEN; URBAN, 2015).

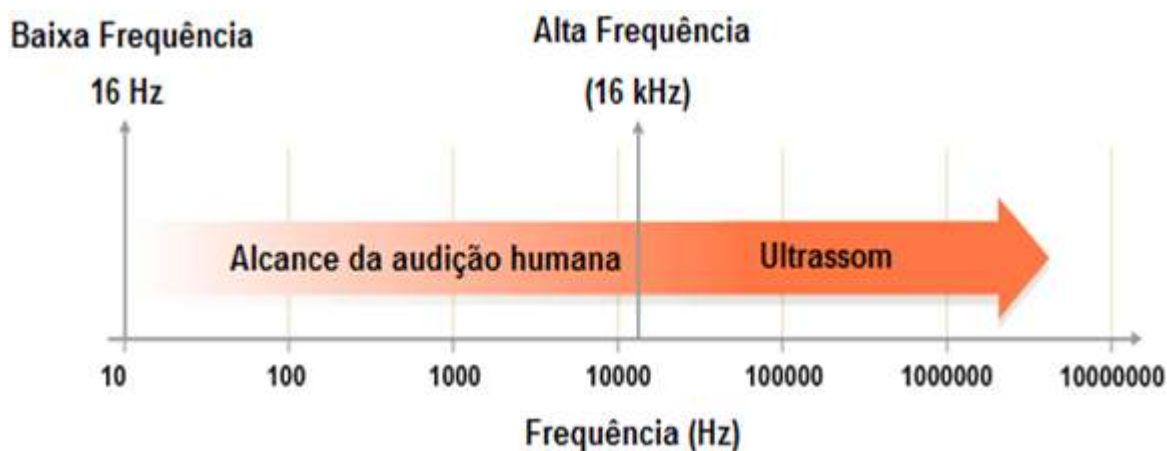
2.4.2 Extração por infusão (EI)

A EI é um método convencional muito simples, frequentemente utilizado na extração de compostos bioativos pelas indústrias de processamento de alimentos (HELENO *et al.*, 2015). O procedimento consiste em manter uma amostra de material vegetal (sementes, folhas, raízes, etc.) em contato com o solvente durante certo período de tempo e a uma temperatura específica. Essa operação permite a retirada do extrato e adição subsequente de solvente puro repetidamente (contudo, estudos indicam que com três mudanças de solvente, o material vegetal é quase completamente esgotado). Em muitos casos, agitação é usada para diminuir o tempo de operação (SARKER; LATIF; GRAY, 2005; ALBUQUERQUE *et al.*, 2016).

2.4.3 Extração assistida por ultrassom (EU)

O uso do ultrassom tem sido considerado uma técnica inovadora e promissora do século XXI, com inúmeras aplicações nos campos farmacêutico, cosmético, químico e alimentício desde a segunda metade do século XX (ROSTAGNO; PRADO, 2013). É considerada uma tecnologia chave para alcançar o objetivo de uma extração "verde" sustentável. O ultrassom é uma onda mecânica que necessita de um meio elástico (líquido) para se espalhar e difere de sons audíveis pela frequência de onda (Figura 13).

Figura 13- Alcance da audição humana e ultrassom.



Fonte: Adaptado de BBC Science (2017)

A partir desta ampla faixa de frequência, distinguem-se dois grupos principais e ambos são utilizados na indústria de alimentos: ultrassons de diagnóstico e de potência. Conforme colocado, a divisão pode ser feita como segue (CHEMAT *et al.*, 2017; TIWARI, 2015):

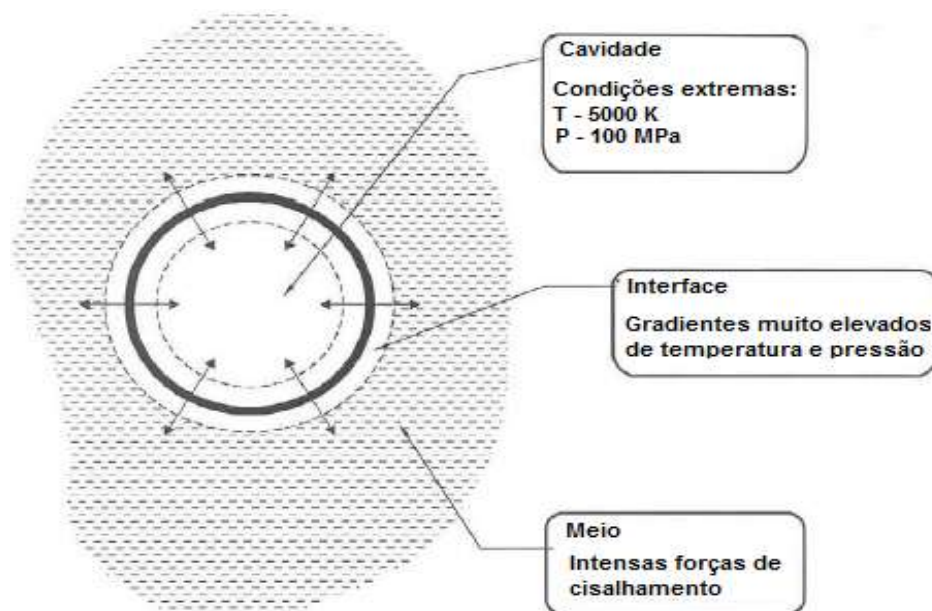
1. Baixa potência e alta frequência (1 – 10 MHz) – diagnósticos clínicos, técnicas de controle de qualidade, controle de processos e inspeções não destrutivas. Esta técnica é mais comumente aplicada como uma técnica analítica para fornecer informações sobre as propriedades físico-químicas de alimentos (por exemplo, firmeza, amadurecimento, teor de açúcar e acidez);
2. Alta potência e baixa frequência (20 – 100 kHz) – processos industriais, reações químicas, operações de extração, tratamentos, etc. É usado para acelerar e melhorar a eficiência da preparação de amostras.

Todos os sistemas ultrassônicos são compostos por um transdutor, que converte energia elétrica em energia sonora, vibrando mecanicamente em frequências ultrassônicas. Embora uma grande variedade de transdutores esteja disponível, o objetivo é o mesmo. O transdutor piezoelétrico é baseado em um material cerâmico cristalino que responde à energia elétrica (citado como o mais eficiente, alcançando eficiência superior a 95%). O ultrassom gerado é irradiado pelo emissor (também chamado de reator), que também pode amplificar as ondas. Entre todos os emissores disponíveis no mercado, os mais utilizados são os banhos ultrassônicos e os sistemas de sondagem ultrassônica (ROSTAGNO; PRADO, 2013).

De acordo com Picó (2013), os efeitos mecânicos do ultrassom proporcionam uma maior penetração do solvente nos materiais celulares e melhoram a transferência de massa devido aos efeitos da microtransmissão. Isso é combinado com um benefício adicional ao se usar ultrassom em processos extrativos, que inclui a destruição das paredes celulares para a liberação do conteúdo celular.

A principal força motriz para os efeitos de extração da sonicação é a cavitação acústica. Quando o ultrassom se propaga através de qualquer meio, induz uma série de compressões e rarefações na matéria, provocando a formação e o colapso de bolhas num meio líquido (TIWARI, 2015). O processo de formação de cavitação é evidenciado pela Figura 14, realizada em três etapas: formação das bolhas (na cavidade, atingindo condições de aproximadamente 5000 K e 100 MPa); crescimento (4 a 5 vezes o tamanho original na interface); e colapso implosivo (ocorrendo no meio).

Figura 14- Cavitação em um meio homogêneo.



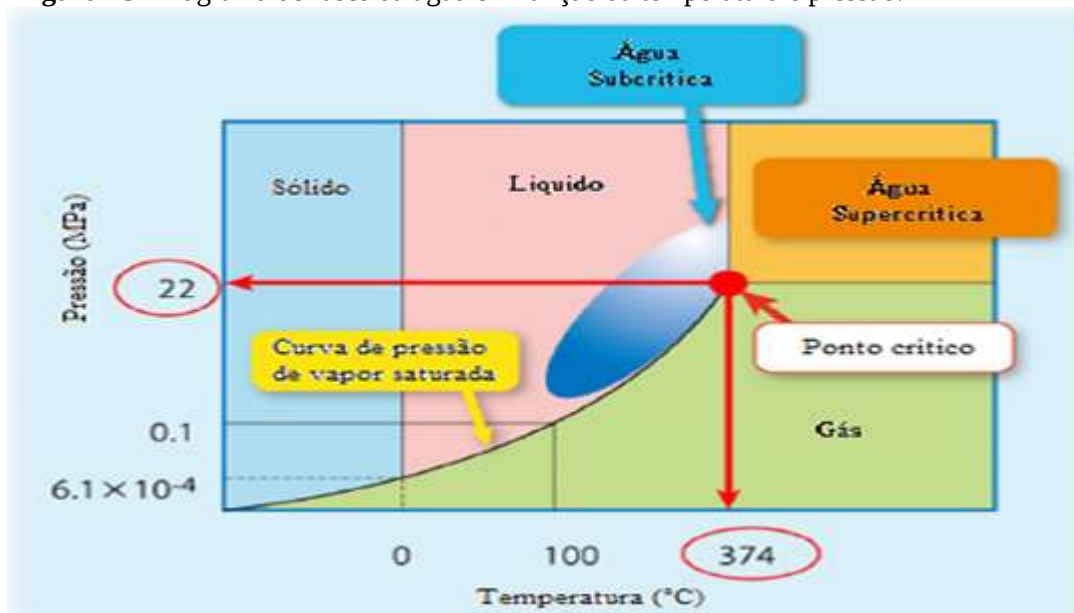
Fonte: Adaptado de Mason e Tiehm (2001)

Em geral, a extração assistida por ultrassom é reconhecida como uma técnica de extração eficiente que reduz dramaticamente os tempos de trabalho, aumentando os rendimentos e, muitas vezes, a qualidade do extrato (PICÓ, 2013). Vários trabalhos realizados utilizaram o método com uma diversidade de plantas: *Plantago major* e *Plantago lanceolata* (MAZZUTTI *et al.*, 2017), butiá (CRUZ *et al.*, 2017), maracujá (OLIVEIRA *et al.*, 2016) e medronheiro (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016). Em todos estes trabalhos altas recuperações de compostos bioativos foram obtidas em diferentes condições de operação.

2.4.4 Extração com Água Subcrítica (EASub)

A extração com água subcrítica, também denominada "água quente comprimida", "extração por água quase supercrítica" ou ainda com o uso do termo "hidrotermal" (descreve a água a altas temperaturas e pressões), faz uso da água líquida mantida a temperaturas entre 100-374 °C e uma pressão de até 221 bar (Figura 15) (NAKAJIMA, 2013; AKGÜL *et al.*, 2014; THIRUVENKADAM *et al.*, 2015).

Figura 15- Diagrama de fases da água em função da temperatura e pressão.



Fonte: Adaptado de Thiruvankadam *et al.* (2015)

Embora muitos dos estudos tenham sido dedicados à água nas condições ambientais, a água apresenta características mais favoráveis como meio para reações orgânicas quando está próxima ou além do seu ponto crítico. Primeiro, a solubilidade de substâncias orgânicas na água aumenta consideravelmente com o aumento da temperatura devido a uma diminuição da constante dielétrica (GLASER *et al.*, 1999), um aumento na taxa de difusão e uma diminuição na viscosidade e tensão superficial. Em consequência, os compostos com polaridades elevadas são facilmente solubilizados em água nas condições ambientais e são extraídos mais eficientemente a temperaturas mais baixas, enquanto que compostos moderadamente polares e apolares requerem um solvente menos polar, induzido então pela elevação de temperatura (NAKAJIMA, 2013).

As propriedades da água sofrem alterações em condições hidrotérmicas. Ao se diminuir a constante dielétrica da água, as espécies orgânicas e os gases tornam-se miscíveis com a água acima do seu ponto crítico, o que reduz as limitações de transferência de massa (AKGÜL *et al.*, 2014). Em um processo de pré-tratamento, a água subcrítica (a altas temperatura e pressão, porém abaixo de seus valores críticos) proporciona velocidades de reação altas que aumentam a extração e subsequente solubilização da matéria orgânica. Por estas razões, a água subcrítica pode ser usada como solvente ambientalmente benigno e sustentável para converter a biomassa úmida em moléculas menores por despolimerização e reações de extração (GLASER *et al.*, 1999). A Tabela

4 apresenta trabalhos encontrados na literatura, onde a água subcrítica foi utilizada para obtenção de compostos de interesse a partir de diferentes matérias-primas vegetais.

Tabela 4. Aplicação de água subcrítica na obtenção de compostos bioativos

Autores (ano)	Compostos extraídos	Material vegetal
Aliakbarian (2012)	Antioxidantes	Resíduos de vinícolas
He <i>et. al.</i> (2012)	Fenólicos	Romã
Budrat e Shotipruk (2009)	Fenólicos	Melão amargo
Ueno <i>et. al.</i> (2008)	Óleos essenciais	Frutas cítricas e ervas
Sereewatthanawut, <i>et. al.</i> (2008)	Antioxidantes	Farinha de canola
Eikani; Golmohammad; Rowshanzamir (2007)	Óleos essenciais	Sementes de coentro
Ozel; Gogus; Lewis (2003)	Proteínas e aminoácidos	Farelo de arroz desidratado
Kubátová <i>et. al.</i> (2002)	Óleos essenciais	Segurelha-anual

Esta técnica pode ser utilizada para outros fins, como por exemplo, a geração de energia. O uso de EASub para a geração de biocombustíveis de algas tornou-se uma estratégia rentável e eficiente, envolvendo a liquefação de biomassa de alto teor de umidade contendo baixo teor de sólidos (5-30%), sem necessidade de operações de desidratação e secagem de culturas intensivas em energia (HASSAS-ROUDSARI *et al.*, 2009).

A aplicação de água, especialmente em condições subcríticas, para o tratamento de solos contaminados, remoção de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (KRONHOLM *et al.*, 2002), hidrocarbonetos em geral e metais (BRUNNER, 2009b), também é citada na literatura, assim como o uso de água na limpeza de materiais ósseos, os quais contêm compostos lipídicos e proteicos que devem ser removidos da matriz sólida para uso em implantes ósseos (DONCHEVA; BRUNNER, 2007).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir, está descrita os métodos e os materiais utilizados para realização do trabalho.

3.1 Obtenção e tratamento do material vegetal

O resíduo agroindustrial foi obtido em parceria com a empresa “FLESH FRUIT”, localizada na cidade do Recife – PE. O material foi constituído de sementes e polpa de *Annona muricata*, coletado majoritariamente nas cercanias da cidade de Garanhuns, interior de Pernambuco. Foram separadas as sementes do material polposo, posteriormente submetidas à secagem em estufa com circulação de ar forçada durante três dias, sob temperatura de 45 °C. Em seguida, foram moídas (em moinho de facas) para obtenção de partículas com granulometria aproximada de 1 mm e armazenadas em frascos fechados.

As folhas de graviola foram obtidas de gravioleiras localizadas também na cidade de Garanhuns. O material vegetal foi submetido ao mesmo processamento que as sementes: seleção (retiradas as folhas com presença de fungos e imperfeições visíveis), secagem, moagem em moinho de facas (partículas com granulometria de 1 mm) e armazenagem em frascos fechados.

As sementes e folhas finamente moídas conforme descrito foram utilizadas nos experimentos em até 120 horas após o término de seus tratamentos, a fim de evitar longos tempos de armazenagem e possível deterioração das matérias-primas. Buscou-se homogeneizar as matérias-primas moídas antes de cada experimento.

3.2 Reagentes

Os reagentes utilizados foram todos da marca Sigma Aldrich®, incluindo: etanol (99,5%, absoluto); DPPH (HPLC, 1 g); ABTS (HPLC, 1 g); Rutina (96% HPLC), Folin & Ciocalteu's phenol, persulfato de potássio (99,0%), carbonato de sódio (99,5%) e Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid, 97%, 1g).

3.3 Extração de compostos da graviola obtidos por Soxhlet (ES)

O processo de extração por Soxhlet foi realizado segundo o proposto por Michielin *et al.* (2011), com modificações. Os extratos das sementes e folhas de graviola foram obtidos com a utilização de etanol como solvente, em proporções de sólido:solvente de 1:10, durante ciclos de

5h, em aparelho de Soxhlet convencional. Em seguida, os extratos foram armazenados em frascos de vidro âmbar para análise posterior. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

3.4 Extração de compostos de graviola por infusão (EI)

Os experimentos foram realizados de acordo com Sousa *et al.* (2007), com modificações. As matérias-primas (folhas e sementes) foram colocadas em infusão em frascos erlenmeyers em contato com solvente (etanol), os quais foram cobertos com papel filme para impedir a evaporação do solvente. As extrações foram conduzidas considerando a relação massa de sólido/solvente de 1:10 ao longo de 96 horas, sem agitação e na temperatura ambiente. Em seguida, o sistema foi filtrado e os extratos armazenados em vidro âmbar. Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata.

3.5 Extração de compostos da graviola utilizando ultrassom (EU)

As extrações assistidas por ultrassom (sementes e folhas) foram realizadas em duplicata, com a mesma proporção de sólido/solvente utilizada para os processos de ES e EI (1:10). O procedimento foi adaptado de Mazzutti *et al.* (2017) com algumas modificações, utilizando 10 g de matéria-prima juntamente com solvente (etanol) em um erlenmeyer. O equipamento consistiu de uma microsonda (Ultronique, Eco-sonics LTDA), com programação para operar em frequência de 18 kHz e potência de 297 W (Figura 16) na temperatura ambiente, por períodos de 15 min.

Figura 16- Equipamento utilizado nos experimentos de extração assistida com ultrassom.



3.6 Extração de compostos de graviola com água subcrítica (EASub)

Os extratos foram obtidos por meio de um reator de fluxo semicontínuo construído inteiramente de aço inox 316L. As Figuras 17 e 18 apresentam o fluxograma e o processo de extração com água subcrítica em reator semicontínuo, respectivamente. O reator tem um volume interno de 50 mL (condições máximas de trabalho de 400 °C e 400 bar). Foi usada uma bomba de líquido de alta pressão (bomba de pistão duplo, CITUA, Campinas, Brasil) para fornecer água pressurizada ao reator. Após a bomba d'água, um sistema de pré-aquecimento de água foi adicionado ao equipamento. A pressão no reator aquecido eletricamente foi monitorada por um manômetro convencional. A temperatura do processo foi controlada por dois termopares do tipo K posicionados na entrada do pré-aquecedor e na saída do reator. A descompressão do sistema foi feita através de uma válvula micrométrica manual (HIP) colocada na saída do reator. Os extratos foram coletados em frascos e armazenados para as análises químicas posteriores.

Figura 17- Esquema do equipamento utilizado para os experimentos com água subcrítica.

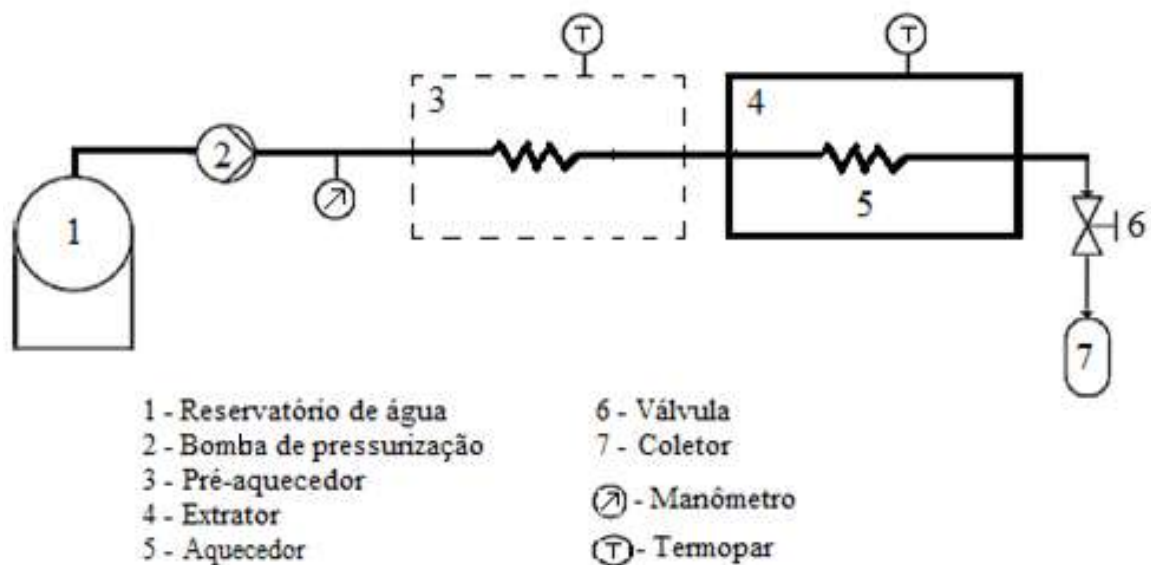
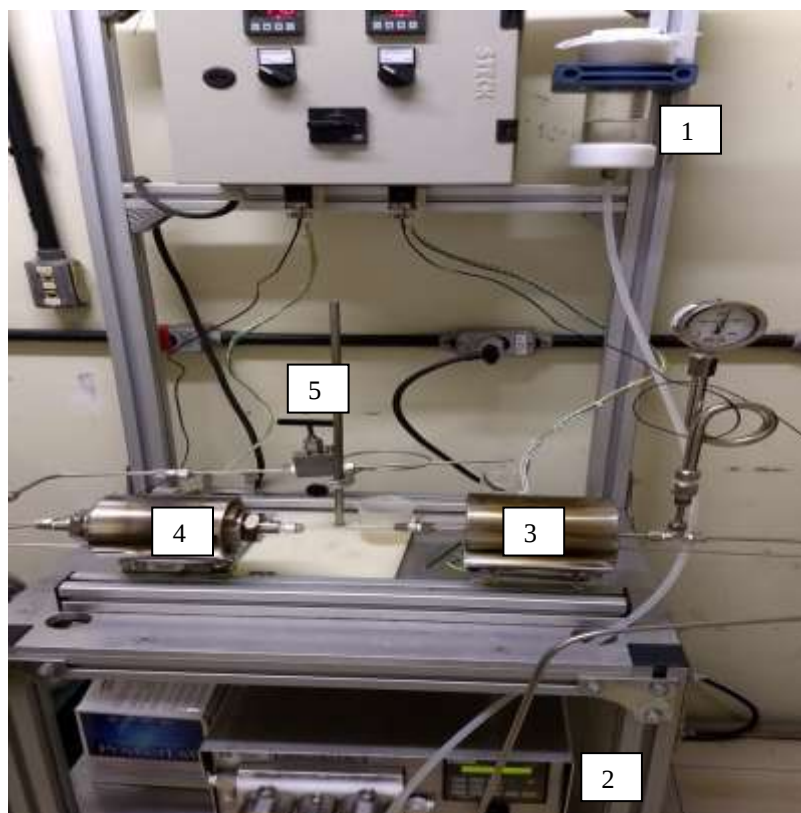


Figura 18- Equipamento utilizado para os experimentos com água subcrítica. 1) Reservatório de água; 2) Bomba de pressurização; 3) Pré-aquecedor; 4) Extrator; 5) Válvula micrométrica.



Antes de cada experimento, foram adicionadas as amostras (sementes ou folhas de graviola) no reator. A bomba de líquido foi utilizada para encher o reator com água, remover o ar residual e para pressurizar o equipamento. Após a pressurização, o sistema de aquecimento e pré-aquecimento foram ligados e ajustados para atingir a temperatura do processo. Uma vez que a temperatura do ponto de ajuste foi atingida, o processo foi iniciado por bombeamento de água através do sistema. As amostras de extrato foram recolhidas após a válvula de descompressão ao final do processo (30 min) e armazenadas em frascos de vidro âmbar antes da análise. Os experimentos foram realizados em duplicata.

3.7 Análises realizadas com os extratos das sementes de graviola

Preliminarmente foram realizadas avaliações dos extratos com base no artigo de Prado *et al.* (2014), com modificações. Os extratos de sementes de graviola neste trabalho foram obtidos por ES, EI, EU e por EASub (4 g de sementes moídas, 160 °C e 200 bar). As análises de

cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida foram realizadas no Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE.

3.7.1 Análise por cromatografia em camada delgada (CCD)

Os extratos e os padrões foram aplicados manualmente (concentração de 1 mg/mL), com auxílio de tubos capilares, em placas cromatográficas de sílica gel 60 - F254 (Macherey-Nagel®, Alemanha). Foram deixadas em saturação por um período de 15 min, aproximadamente, na temperatura ambiente. A fase móvel foi utilizada de acordo com o metabólito desejado (Tabela 5). Após a eluição nas placas, as mesmas foram secas à temperatura ambiente, e observadas sob luz ultravioleta em comprimentos de onda entre 254 e 365 nm. As bandas obtidas foram comparadas às bandas dos padrões correspondentes, em termos de coloração e resultado de faixa.

Tabela 5. Sistemas, reveladores e padrões utilizados nas análises por CCD.

Classe de metabólito	Sistema	Revelador	Padrão
Taninos hidrolisáveis	90 : 5 : 5	Cloreto férrico	Ácido gálico
Taninos condensados		Vanilina clorídica	Catequina
Flavonoides		Cloreto de alumínio	Rutina
Derivados cinâmicos			Ácido cafeico

Sistema: 90:5:5 – Acetato de etila : ácido fórmico : água; mL

Fonte: Ferreira e Soares (2017)

3.7.2 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Segundo Ferreira e Soares (2017), os extratos obtidos foram diluídos em etanol para um balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se ao final soluções com concentração igual a 1 mg/mL. Estas soluções foram filtradas para *vials* de PVDF com diâmetro de 25 mm e tamanho de poro de 0,45 µm. A análise por CLAE foi realizada num sistema de HPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, EUA), acoplado a um detector arranjo de fotodiodo (DAD; Thermo Fisher Scientific, EUA) e equipado com bomba binária (HPG-3x00RS, Thermo Fisher Scientific, EUA), degaseificador e amostrador automático equipado com um loop de 20 µL (ACC-3000, Thermo Fisher Scientific, EUA). Os comprimentos de onda foram fixos em 210, 254, 280 e 350 nm para a detecção de taninos hidrolisáveis e flavonoides. As separações cromatográficas foram obtidas

com uma coluna C18 (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 μ m, Dionex®, EUA) equipada com pré-coluna (C18 de 4 mm x 3,9 m; Phenomenex®). As separações foram efetuadas na temperatura de 26 °C. A fase móvel foi constituída por água ultrapura (A) e metanol (B), ambos acidificados com ácido trifluoroacético a 0,05%, e vazão ajustada a 0,7 mL/min. Um programa de gradiente foi aplicado como segue:

- 0-10 min, 10-25% de B;
- 10-15 min, 25-40% de B;
- 15-30 min, 40-75% de B;
- 30-34 min, 75% B;
- 33-35 min, 75-15% de B.

Para a análise e processamento dos dados, o software Chromeleon 6.8 (Dionex/Thermo Fisher Scientific, EUA) foi utilizado.

3.8 Análises realizadas com os extratos das folhas de graviola

3.8.1 Quantificação de polifenóis totais (PFT)

Para a quantificação dos polifenóis totais presentes nos extratos das folhas de graviola, a metodologia de Folin-Ciocalteu foi utilizada (FOLIN e CIOCALTEU, 1927) com modificações. Em um balão de 25 mL foram adicionados 1 mL do reagente Folin-Ciocalteu e 10 mL de água destilada. Na sequência, 225 μ L dessa amostra foram pipetados (utilizada micropipeta monocanal), com o volume completado com solução aquosa de carbonato de sódio (Na_2CO_3), a 10,75% (m/v). As soluções foram mantidas em repouso por 30 minutos em ausência de luz à temperatura ambiente e, logo em seguida, suas leituras foram verificadas em espectrofotômetro a 760 nm. Água destilada foi usada como branco nas leituras. O padrão utilizado foi o ácido gálico (1 mg/mL). Seguiu-se com o mesmo procedimento, mas usando apenas 100 μ L de ácido gálico ao invés da amostra. Ambos os procedimentos foram realizados em triplicata.

3.8.2 Atividade antioxidante total (AAT) pelo método DPPH

A análise de atividade antioxidante total (AAT) pelo método DPPH foi feita conforme a metodologia descrita por Rufino *et al.* (2007a) com modificações. Em ambiente escuro, foram

feitas diluições em tubos de ensaios dos extratos das folhas de graviola (500, 250, 125, 50, 25, 10 e 5 µg/mL), em triplicata, totalizando um volume final de 2500 µL. Foram aferidos 1000 µL de reagente DPPH (0,3 mM) com homogeneização em agitador. A solução resultante, então, foi incubada por 30 minutos. Em seguida, foram analisadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 517 nm. Para cada diluição, apenas um branco foi feito (o extrato da respectiva concentração com o solvente de extração). Além disso, foi utilizado um controle negativo contendo apenas o solvente de diluição e DPPH. Foi calculado o percentual de inibição da amostra testada sobre o radical DPPH por

$$AA(\%) = 100 - \left[\frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) * 100}{Abs_{controle}} \right] \quad (1)$$

em que AA (%) representa a atividade antioxidante em percentual; Abs_{amostra} é a absorbância da amostra; Abs_{branco} é a absorbância do branco; e Abs_{controle} representa a absorbância do controle. Com os resultados, foi plotado um gráfico com a concentração nas abscissas e a atividade antioxidante nas ordenadas e traçadas as três equações de reta.

O EC₅₀ é a concentração mínima eficaz necessária para decrescer a quantidade inicial de DPPH em 50%. Para calcular o EC₅₀ utilizaram-se as equações da reta para obter o valor (em µg/mL), e então, calcularam-se a média e o desvio padrão para as amostras analisadas. A atividade antioxidante total (método DPPH) indica que quanto maior a atividade antioxidante, mais baixo é o valor de EC₅₀ (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). O radical DPPH reage rapidamente com alguns fenóis e α-tocoferol. Contudo, ocorrem reações secundárias simultaneamente de forma lenta, causando um progressivo decréscimo na absorbância, podendo demorar várias horas para que a reação seja estabilizada. Dessa forma, a interpretação dos resultados do método DPPH são frequentemente expressos como EC₅₀ (concentração eficiente), definido como a concentração de substrato que provoca a perda de 50% da atividade DPPH (cor) no período de tempo especificado, em geral de 30 a 60 min (SANTOS *et al.*, 2014).

3.8.3 Atividade antioxidante total pelo método ABTS

A atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+} foi feita conforme a metodologia descrita por Rufino *et al.* (2007b) com modificações. O radical ABTS^{•+} foi formado pela reação de 5 mL

da solução ABTS (7 mM) com 88 μL de solução de persulfato de potássio (140 mM), incubados na temperatura ambiente e na ausência de luz, durante 16 horas. Uma vez formado, o radical ABTS foi diluído com etanol até a obtenção do valor de absorbância de $0,700 \pm 0,020$ a 734 nm.

Em seguida, preparou-se uma solução padrão de Trolox (2 mM), um antioxidante sintético análogo à vitamina E. A partir desta solução foram preparadas em balões volumétricos de 10 mL soluções variando as concentrações: 0, 20, 50, 100, 500, 1000, 1500 a 2000 μM . Em ambiente escuro, transferiu-se 30 μL de cada solução de Trolox para tubos de ensaio, contendo 3 mL da solução do radical ABTS. A leitura foi realizada após 6 minutos da mistura. Etanol foi utilizado como branco na calibração. Sendo assim, plotaram-se as concentrações de trolox (μM) na abscissa e as respectivas absorbâncias na ordenada e determinou-se a equação da reta.

Posteriormente, a partir dos extratos das folhas de graviola obtidos pelos diferentes métodos de extração (ES, EI, EU e EASub), foram preparadas diluições com quatro concentrações diferentes: 1000, 500, 250 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Em ambiente escuro, transferiu-se um alíquota de 30 μL de cada diluição dos extratos para tubos de ensaio com 3 mL do radical ABTS, em triplicata. A leitura foi feita após 6 minutos de reação a 734 nm, e o etanol foi utilizado como branco. A partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos, plotou-se a absorbância no eixo y e a diluição (mg/L) no eixo x. Em seguida, determinou-se a equação da reta. O cálculo da AAT foi feito substituindo na equação da reta a absorbância equivalente à 1000 μM do padrão Trolox. A partir do resultado encontrado pela equação da reta, dividiu-se o mesmo por 1000 para se obter o valor da massa (em gramas). O resultado final foi calculado pela divisão de 1000 (μM) pelo valor da massa e multiplicado pela quantidade de material vegetal (folhas) para encontrar o valor final, expresso em μM Trolox/g de folha.

3.8.4 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A metodologia foi empregada conforme descrita na Seção 3.7.2, modificando apenas a etapa de diluição das amostras com água (ao invés de etanol) para balão volumétrico de 10 mL.

3.8.5 Planejamento fatorial

O planejamento fatorial foi aplicado somente ao processo de EASub usando as folhas de graviola como matéria-prima. Tal planejamento permite otimizar o processo, investigar a influência dos fatores na resposta desejada e determinar as condições ótimas usando a superfície

de resposta. Dessa forma, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 com o objetivo de estudar o efeito das variáveis operacionais (quantidade de material vegetal, temperatura e pressão) dentro das limitações do equipamento de EASub, a fim de obter as maiores quantidades possíveis de polifenóis totais a partir de folhas de graviola ao longo de 30 minutos de processo. Os níveis considerados estão expressos na Tabela 6. As análises foram realizadas em duplicata e o ponto central em triplicata.

Tabela 6. Níveis e variáveis do planejamento fatorial completo 2^3

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Massa (g)	2	3	4
Temperatura (°C)	125	137	150
Pressão (bar)	200	212	225

Nesse procedimento foi mantida fixa a vazão de água no sistema em 5,67 mL/min; com isso, a relação solvente/sólido ao longo dos 30 minutos de extração para os níveis (-1, 0 e +1) foram de: 85; 56,7 e 42,5 g/g, respectivamente.

3.8.6 Análise Estatística

Os efeitos das variáveis sobre o processo de EASub (planejamento fatorial) foram avaliados com o auxílio do programa Statistica 8.0. Os resultados obtidos dos CFs (PFT) e das AAT foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram submetidas ao teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Além disso, foi realizada a correlação dos coeficientes (CFs vs DPPH) pelo método de Pearson.

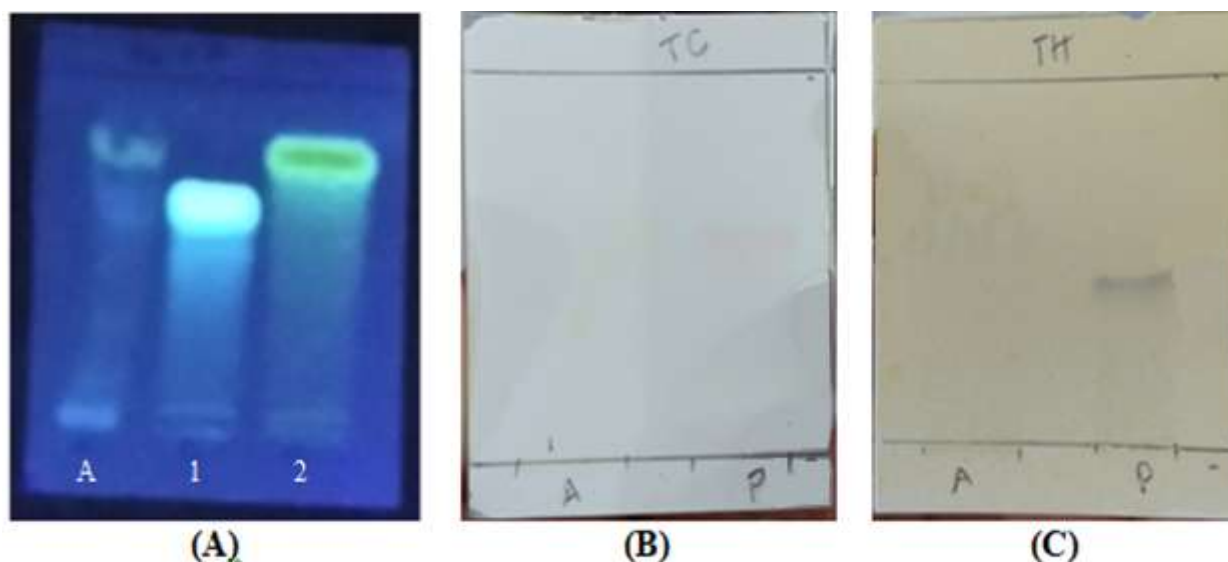
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir está descrito os resultados obtidos das análises feitas neste trabalho.

4.1 Extratos obtidos a partir das sementes de graviola

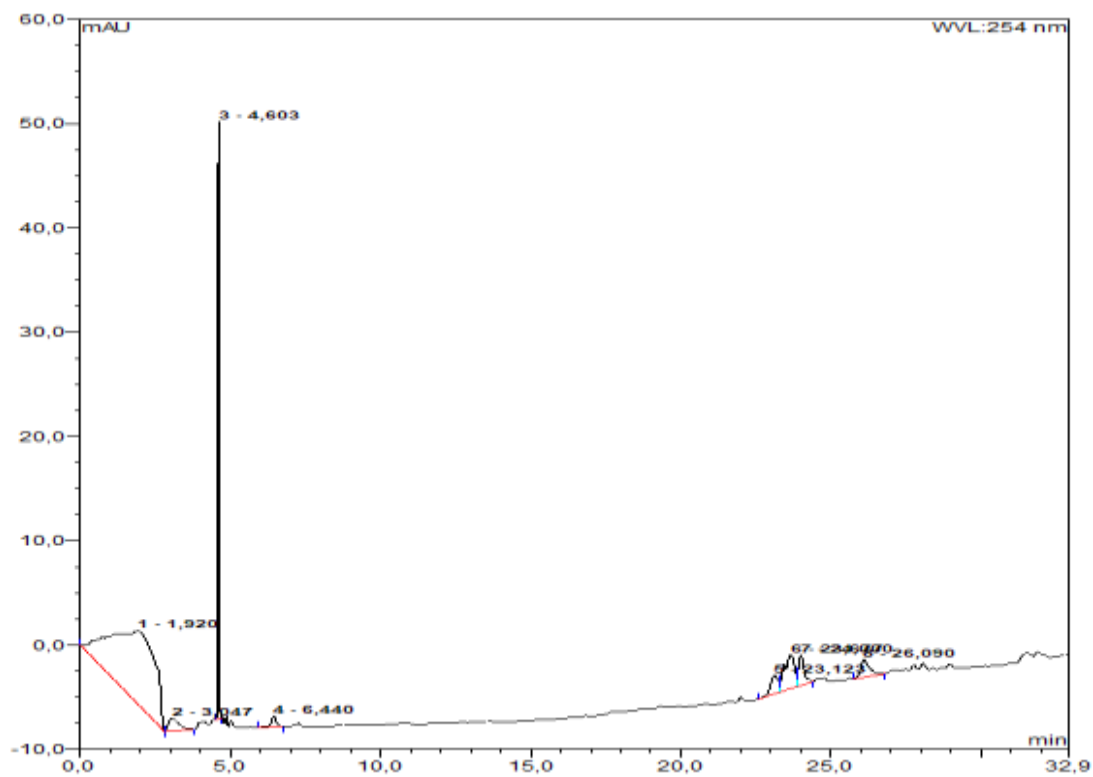
O resíduo agroindustrial fornecido pela empresa “FLESH FRUIT” foi separado, seco, moído e armazenado conforme descrito na Seção 3.1. Após essas etapas, foi realizado um *screening*, obtendo extratos pelos métodos de Soxhlet, ultrassom, infusão e com água subcrítica. Com isso, foram realizadas análises iniciais de CCD (Seção 3.7.1) com o intuito de verificar a presença de compostos fenólicos, como flavonoides, derivados cinâmicos e taninos condensados e hidrolisados. A Figura 19 apresenta os resultados das análises dos extratos de semente de graviola obtidos por EASub (nas condições de 160 °C e 200 bar).

Figura 19- Resultados de CCD para os extratos de semente de graviola através de EASub para (A) derivados cinâmicos (1) e flavonoides (2); (B) taninos condensados; (C) taninos hidrolisados.

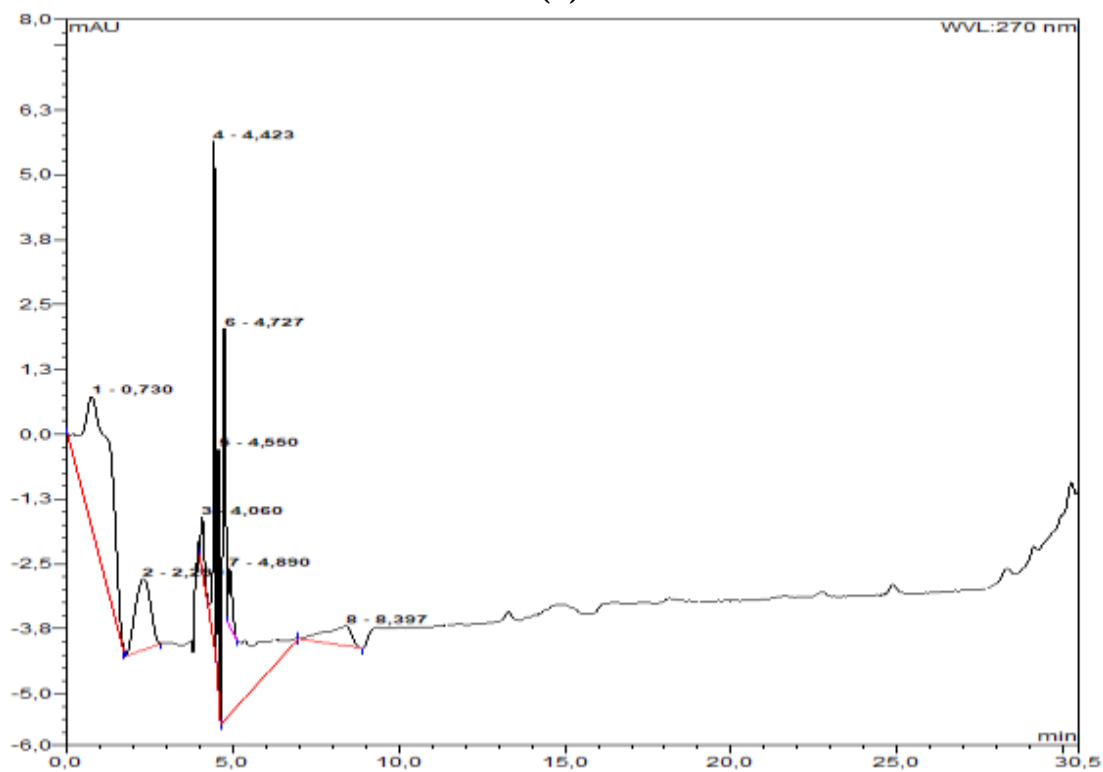


De acordo com as análises de CCD apresentadas na Figura 19, não foi identificada a presença de compostos fenólicos nos extratos de sementes de graviola, com exceção de flavonoides, apresentando traços de rutina. Dessa forma, foram realizadas análises de CLAE, seguindo a metodologia descrita na Seção 3.7.2. As Figuras 20 e 21 apresentam os resultados das análises de CLAE obtidas utilizando os métodos de extração por Soxhlet, infusão, ultrassom e EASub. Para fins de comparação, a Figura 22 apresenta o cromatograma obtido para o padrão rutina injetado isoladamente nas mesmas condições.

Figura 20- Resultados da CLAE para os extratos obtidos na extração das sementes de graviola por (A) Soxhlet e (B) infusão.



(A)



(B)

Figura 21- Resultados da CLAE para os extratos obtidos na extração das sementes de graviola usando (A) ultrassom e (B) água subcrítica.

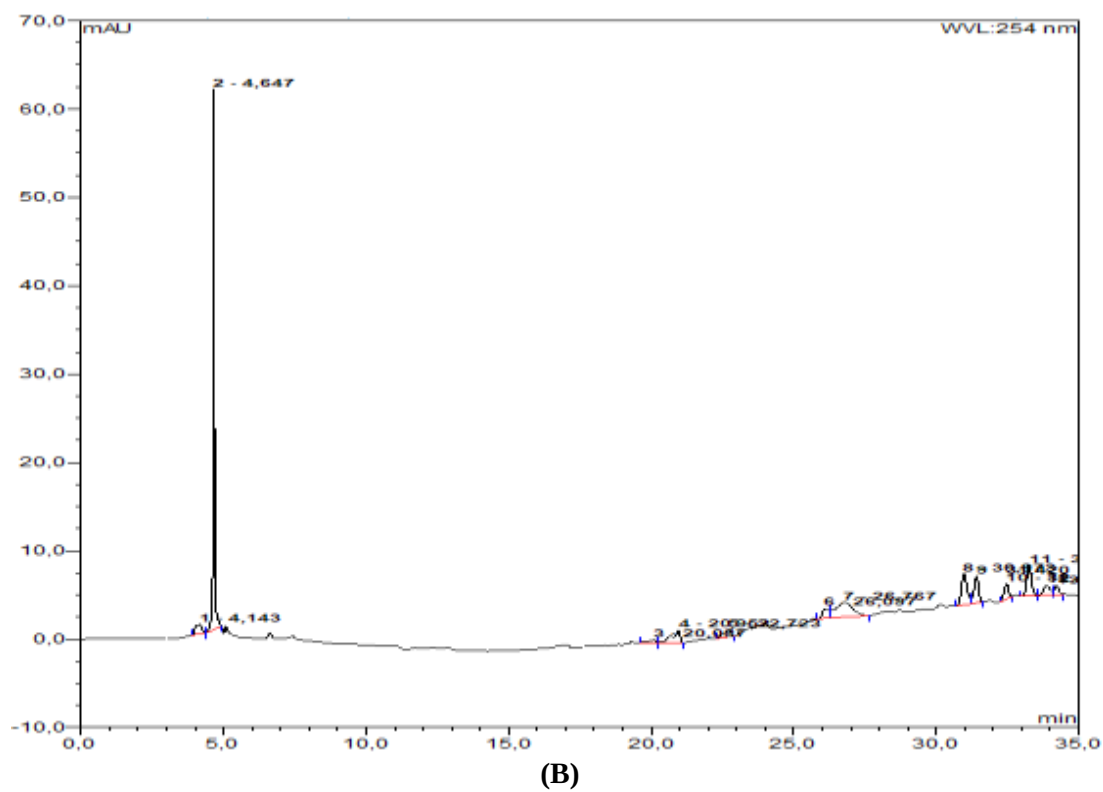
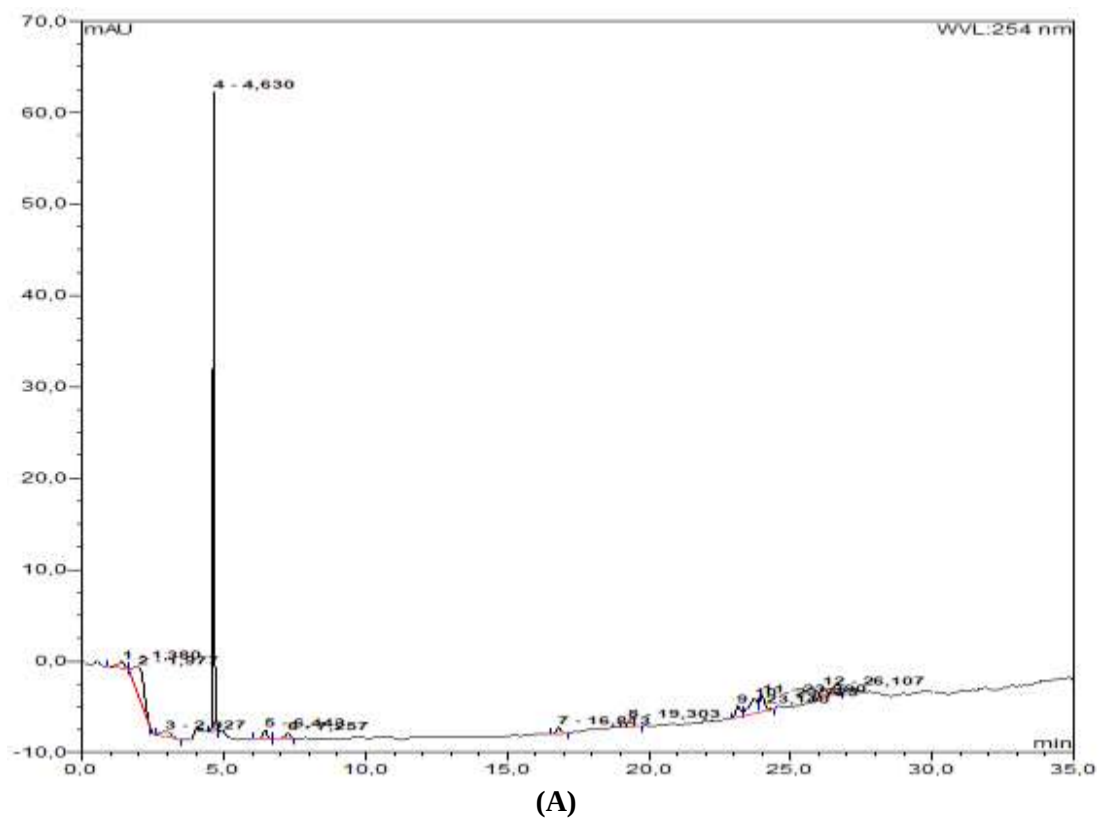
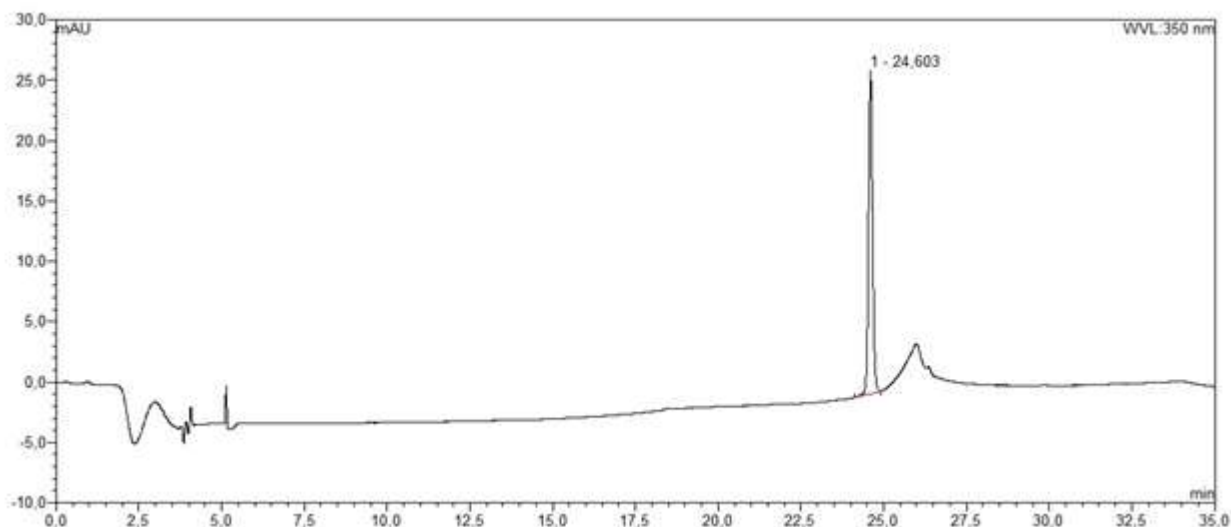


Figura 22- Resultados da CLAE para a injeção isolada do padrão rutina.



Apesar da presença de alguns picos nos cromatogramas das Figuras 20 e 21 (o pico próximo aos 5 min de retenção trata-se do solvente), não foram observados compostos fenólicos nas amostras dos extratos de sementes de graviola. Através da comparação das Figuras 20, 21 e 22 comprovou-se a inexistência do flavonoide rutina nos resultados das análises dos extratos das sementes de graviola por CLAE. Uma das possíveis explicações para não haver evidências de compostos fenólicos pode ser o fator fenótipo e/ou sazonalidade da planta. De acordo com o período de colheita dos frutos, a fonte de nutrientes fornecida à planta para o seu desenvolvimento, reprodução e proteção, pode não ter sido suficiente para a produção de tais compostos (SODEIFIAN; SAJADIAN; ARDESTANI, 2016), embora a matéria-prima tenha sido coletada aproximadamente na mesma região e mesma época de colheita (Seção 3.1).

Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura. Barata *et al.* (2009) afirmaram que nas sementes são encontrados principalmente ciclopeptídeos (como anomuricatina B), hexapeptídeos cíclicos (como anomuricatinas A e C) e diversas acetogeninas, que também são encontradas nas folhas, cascas e raízes. Além disso, as sementes de graviola são ricas em ácidos graxos neutros, o que dificulta a extração de acetogeninas e outros princípios ativos pelo processo clássico de extração por solventes. Coria-Téllez *et al.* (2018) relataram que são encontrados duzentos e doze distintos compostos bioativos na graviola (em predominância no fruto e folhas), com evidências de acetogeninas, alcaloides e fenóis, dentre outros compostos minoritários.

Os resultados preliminares obtidos nas análises dos extratos de sementes de graviola por ES, EI, EU e EASub evidenciaram a inexistência de compostos fenólicos nesta matéria-prima vegetal. Assim, optou-se por investigar, a partir de então, as folhas de graviola como matéria-prima inicial na busca de compostos fenólicos, compostos de interesse na indústria e que podem vir a agregar maior valor à cadeia produtiva da graviola.

4.2 Extratos obtidos a partir das folhas de graviola

4.2.1 Quantificação de polifenóis totais (PFT)

Conforme discutido nas Seções anteriores, estudos químicos com *A. muricata* conduziram ao isolamento de compostos de diversas classes químicas, tais como acetogeninas, alcaloides, terpenoides, carboidratos, polifenóis, lipídeos e aminoácidos. Todavia, nos últimos anos, as pesquisas fotoquímicas acerca desta espécie se dirigiram unicamente ao isolamento de compostos utilizando as folhas como matéria-prima (SANTOS *et al.*, 2014).

Para a extração de compostos bioativos de folhas de graviola foi realizado um planejamento fatorial 2^3 aplicado à EASub, variando-se a massa de sólido, temperatura e pressão nos níveis descritos na Seção 3.8.5. Desta forma, os resultados obtidos para a quantidade de polifenóis totais são apresentados na Tabela 7 (níveis de codificação de acordo com a Tabela 6). Para cada nível, as extrações foram realizadas em duplicata e o ponto central em triplicata, assim como as análises.

Tabela 7. Níveis de codificação e médias dos polifenóis totais obtidos nos experimentos de EASub.

Níveis			PFT (% AG/g amostra)
Massa	Temperatura	Pressão	
-1	-1	-1	0,75 ± 0,05
+1	-1	-1	0,74 ± 0,00
-1	+1	-1	1,49 ± 0,02
+1	+1	-1	0,94 ± 0,23
-1	-1	+1	0,97 ± 0,20
+1	-1	+1	0,64 ± 0,04
-1	+1	+1	1,51 ± 0,37
+1	+1	+1	2,37 ± 0,35
0	0	0	1,03 ± 0,29
0	0	0	1,57 ± 0,38
0	0	0	1,29 ± 0,32

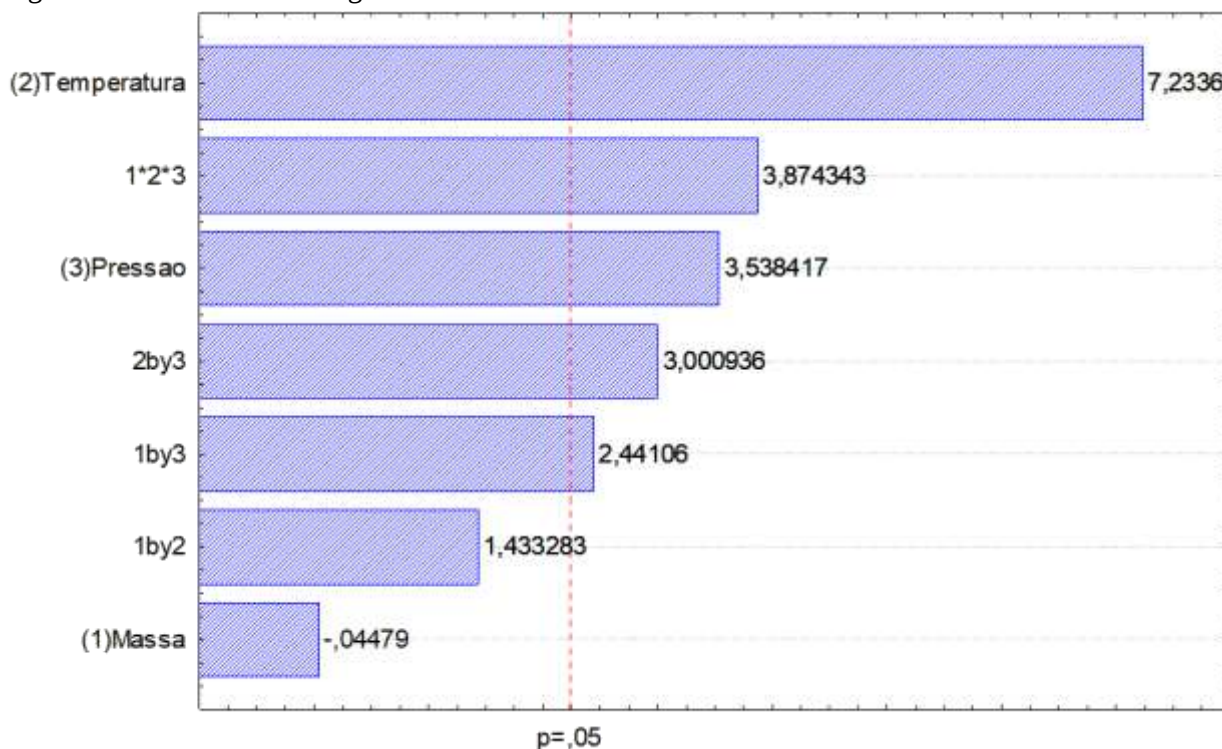
% de ácido gálico/g de folha

Analisando a Tabela 7 pode-se observar que o ponto ótimo para obtenção de PFT por meio de extração com água subcrítica foi o nível máximo, com 4 g de folhas de graviola, em 150 °C e 225 bar, atingindo 2,37% (equivalente à ácido gálico por grama de folha).

O trabalho de Michielin *et al.* (2011) reportou a extração de *C. verbenacea* por vários métodos. Obtiveram nas análises de PFT em torno de 24% (AG/g de amostra), utilizando água via extração Soxhlet, 0,6% (AG/g de amostra) no uso de água por infusão e 0,9% (AG/g de amostra) aplicando hidrodestilação. Além desses resultados, o mesmo trabalho registrou extrações variando de 2,2 a 5,0% (AG/g de amostra) utilizando dióxido de carbono supercrítico.

A partir do planejamento fatorial 2³ foi possível avaliar a influência de cada variável estudada para o aumento na obtenção de polifenóis totais, com os resultados exibidos na Figura 23 (gráfico de Pareto dos efeitos significativos do planejamento). As Figuras 24 e 25 apresentam o gráfico com as interações significativas e a superfície de resposta do planejamento fatorial, respectivamente.

Figura 23- Gráfico de Pareto dos efeitos significativos do planejamento fatorial 2^3 na extração com água subcrítica de folhas de graviola na análise de PFT.



De acordo com a Figura 23, dentre os efeitos principais, tem-se que em média a temperatura e a pressão foram significativas a um nível de 95% de confiança, e entre os efeitos secundários e terciários, apenas a interação massa (1) e temperatura (2) não foi significativa ($p < 0,05$). Com estes dados é possível afirmar que a temperatura e a pressão têm um papel importante no que se refere à extração de polifenóis totais de folhas de *A. muricata* com EASub.

Na Figura 24 pode-se observar que, ao se elevar a pressão, a temperatura ou ambas, obtêm-se os melhores resultados na extração de compostos fenólicos de folhas de graviola por meio de extração com água subcrítica. Já na Figura 25, a superfície de resposta apresenta a equação (2) e ilustra que o ponto máximo de extração com água subcrítica ainda não foi atingido.

$$y = 1,195 + 0,807X_2 + 0,395X_3 + 0,272X_1X_3 + 0,335X_2X_3 + 0,432X_1X_2X_3 \quad (2)$$

Figura 24- Cubo das interações significativas do planejamento fatorial 2^3 para os experimentos de EASub.

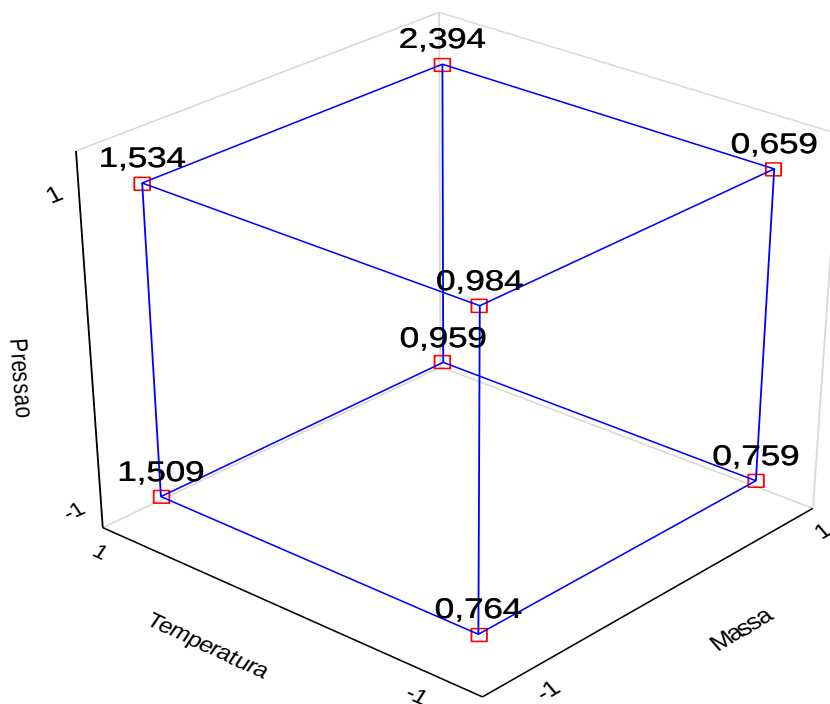
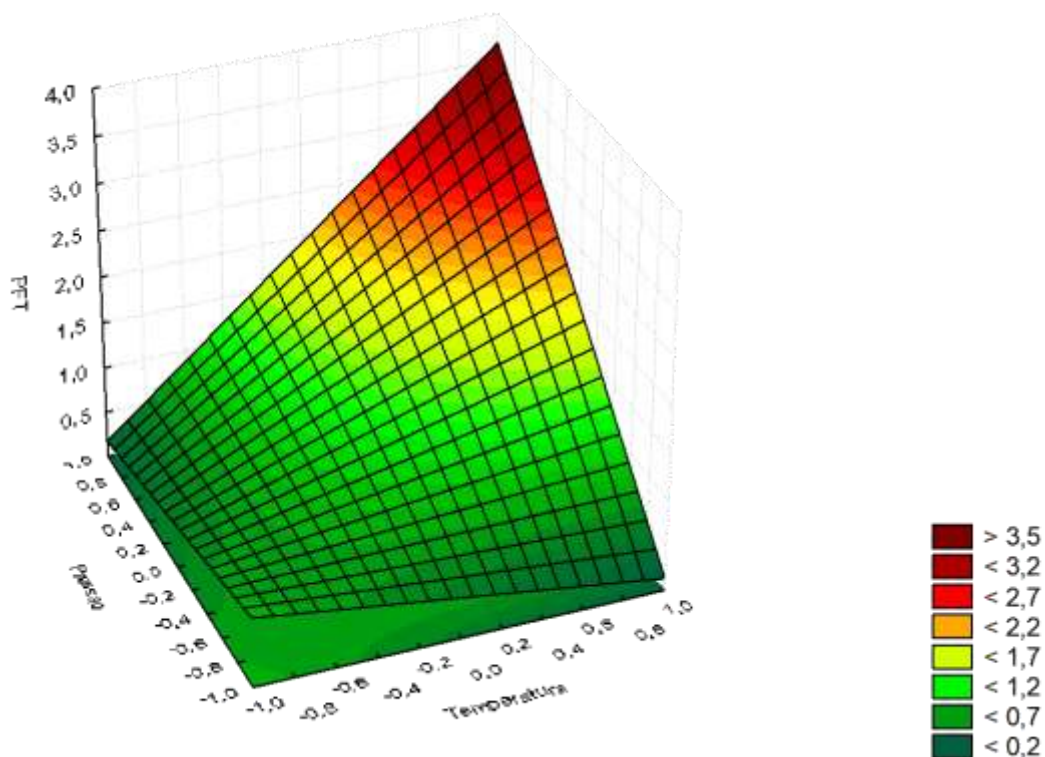


Figura 25- Superfície de resposta do planejamento fatorial 2^3 para os experimentos de EASub.



4.2.2 Resultados das análises de AAT

A partir dos resultados apresentados na Tabela 7, o ponto ótimo do planejamento fatorial (EASub, 4 g de folhas de graviola, 150 °C e 225 bar) foi tomado para comparação com os outros métodos de extração avaliados. As comparações foram feitas, portanto, considerando polifenóis totais e atividades antioxidantes totais (métodos DPPH e ABTS). Com o auxílio do teste de Tukey, as médias foram avaliadas com as diferenças significativas para cada tipo de extração a um nível de 95% de significância. Os dados obtidos na comparação estão expressos na Tabela 8.

Tabela 8. Comparação dos métodos na extração de folhas de graviola (obtenção de polifenóis totais e atividades antioxidantes totais).

Método de extração	PFT ¹ (% AG/g amostra)*	DPPH ¹ (EC ₅₀ µg/mL)	ABTS ¹ (mM Trolox/g de folha)
Soxhlet	2,83 ^d ± 0,00	228,86 ^a ± 2,07	12,24 ^b ± 0,80
Infusão	1,41 ^a ± 0,14	257,20 ^b ± 17,46	10,79 ^{a,b} ± 3,30
Ultrassom	1,66 ^b ± 0,06	266,39 ^b ± 5,70	8,61 ^a ± 1,76
Água subcrítica	2,37 ^c ± 0,35	394,32 ^c ± 5,70	11,06 ^{a,b} ± 1,12

¹ - Na mesma coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Teste de Tukey ao nível de 95 % de significância

* - % de ácido gálico/g de folha

A partir da Tabela 8, pode-se chegar às seguintes afirmações: o método mais adequado dentre os analisados para a obtenção de polifenóis totais foi a extração por Soxhlet com uso de etanol, obtendo 2,83% (equivalente à ácido gálico/g de folha). Além disso, a extração por Soxhlet foi a que apresentou atividades antioxidantes mais elevadas, tanto pelo método DPPH quanto pelo método ABTS. A extração com água subcrítica obteve desempenho inferior apenas em relação à extração com Soxhlet para as análises de PFT e ABTS. Contudo, apresentou a menor AAT segundo o método DPPH.

Em relação ao resultado de AAT pelo método DPPH, Kalidindi *et al.* (2015) relataram comportamento semelhante ao avaliarem a atividade antioxidante das folhas de *Annona squamosa* Linn. por maceração com uso de diferentes solventes, onde a extração com água

apresentou menor resultado (EC_{50} de 439,6 mg/mL) em comparação com extratos obtidos com clorofórmio e com metanol (EC_{50} de 308,3 mg/mL e 342,5 mg/mL, respectivamente).

De acordo com a literatura (Tabela 2), Moraes *et al.* (2016) obtiveram resultados de PFT semelhantes a este trabalho ao avaliarem a cocção com água de folhas de graviola (33,0 mg AG/g). Além disso, pode-se notar uma ampla faixa de extração de polifenóis totais na literatura, desde 18,6 até 358,9 (mg AG/100g) para a polpa de graviola e de 33,0 até 100,3 (mg AG/g) para as folhas de graviola. Os motivos para essa variação vão desde o método aplicado na extração (tipo e condições), o tipo de solvente utilizado e a parte do material vegetal estudada. Além desses fatores, parâmetros não informados por muitos trabalhos já citados com papel importante na quantificação de CFs, são a sazonalidade ou o grau de maturação das matérias-primas.

Kuskoski *et al.* (2005) analisaram polifenóis, antocianinas e as atividades antioxidantes de frutas tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas, incluindo a graviola. Os resultados do trabalho atual divergiram em relação aos obtidos pelos autores que encontraram um índice de polifenóis totais de 84,3 mg/100 g de polpa de graviola; a fruta também demonstrou alta capacidade antioxidante, apresentando 2,88 μ mol/g de atividade antioxidante equivalente ao Trolox. Devido aos estudos serem com diferentes partes da graviola, esta divergência nos resultados obtidos pode ser justificada.

A atividade antioxidante por ABTS pode ser avaliada de forma oposta ao DPPH, onde quanto maior o valor encontrado, mais elevada será a atividade antioxidante do material vegetal investigado. Contudo, Magalhães *et al.* (2008) relataram a possibilidade de interferência de determinados compostos químicos na avaliação da atividade antioxidante por ABTS, desde que estes apresentem um potencial redutor inferior ao do $ABTS^{*+}$, os quais podem reagir com o radical e superestimar os valores obtidos.

4.2.3 Resultados das análises por CLAE

Neste estudo, 11 distintos picos referentes a compostos fenólicos foram observados nas amostras com o uso de água subcrítica caracterizados por CLAE, enquanto para todos os outros processos de extração (Soxhlet, infusão e ultrassom), nos quais o solvente utilizado foi o etanol, foram apenas quatro picos (compostos) encontrados. Contudo, alguns compostos foram obtidos em maior concentração através de ES, como pode ser observado nas Figuras 26 e 27. Os

resultados da EASub demonstraram que esta técnica foi a mais adequada para a extração de compostos fenólicos entre os métodos analisados. Esta elevada extração de CFs deve-se ao fato de que os compostos orgânicos são prontamente dissolvidos por água na região quase crítica e supercrítica até a total miscibilidade. Por outro lado, o poder solvente da água diminui para os compostos inorgânicos na proximidade da região crítica e acima dela (BRUNNER, 2009a).

Nos estudos de Jiménez *et al.* (2014), 16 CFs foram extraídos em duas frações de amostras de polpa de fruta seca (*Annona muricata*), as quais foram caracterizadas parcialmente por CLAE com matriz de diodos e detecção por espectrometria de massa. Dentre os compostos identificados, destacam-se os derivados de ácido cinâmico, hexoses de ácido cumárico, derivados de ácido cafeico, ácido cafeoilquínico, feruloilglicosídeos e ésteres metílicos do ácido cumárico, dentre outros.

Figura 26- Resultados da CLAE para os extratos obtidos na extração das folhas de graviola por (A) Soxhlet e (B) infusão.

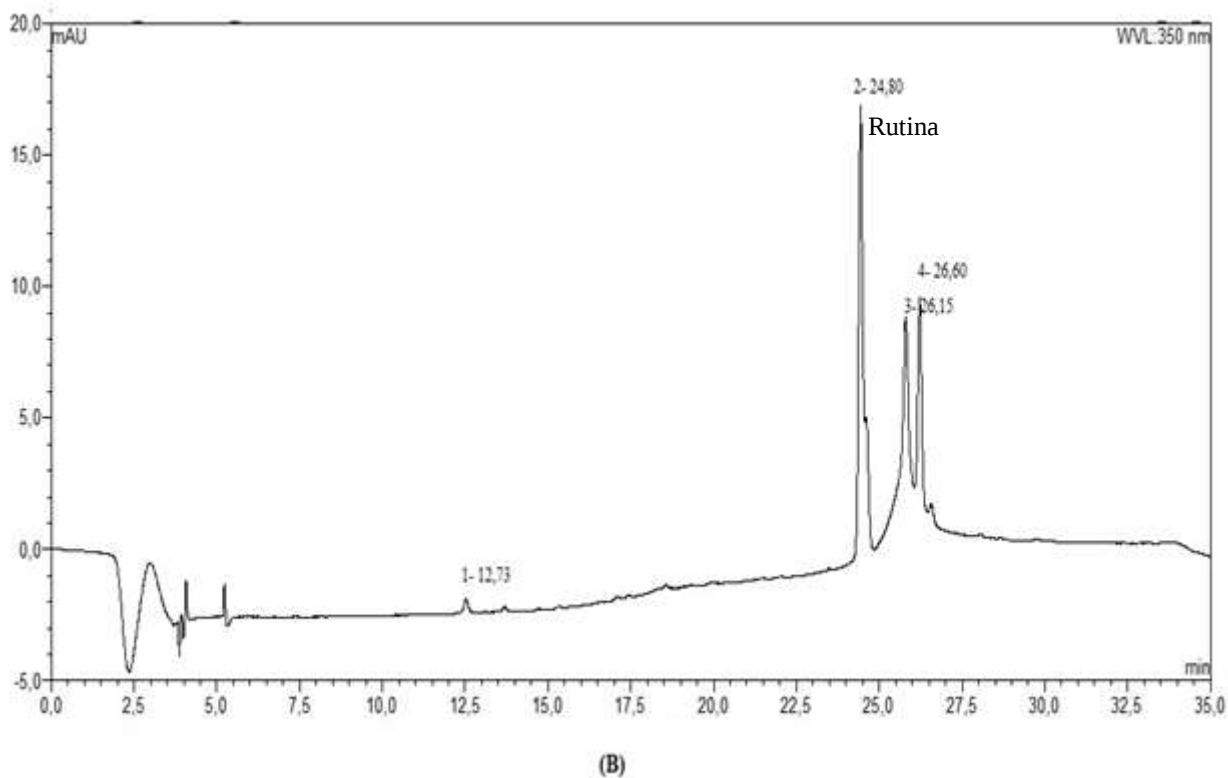
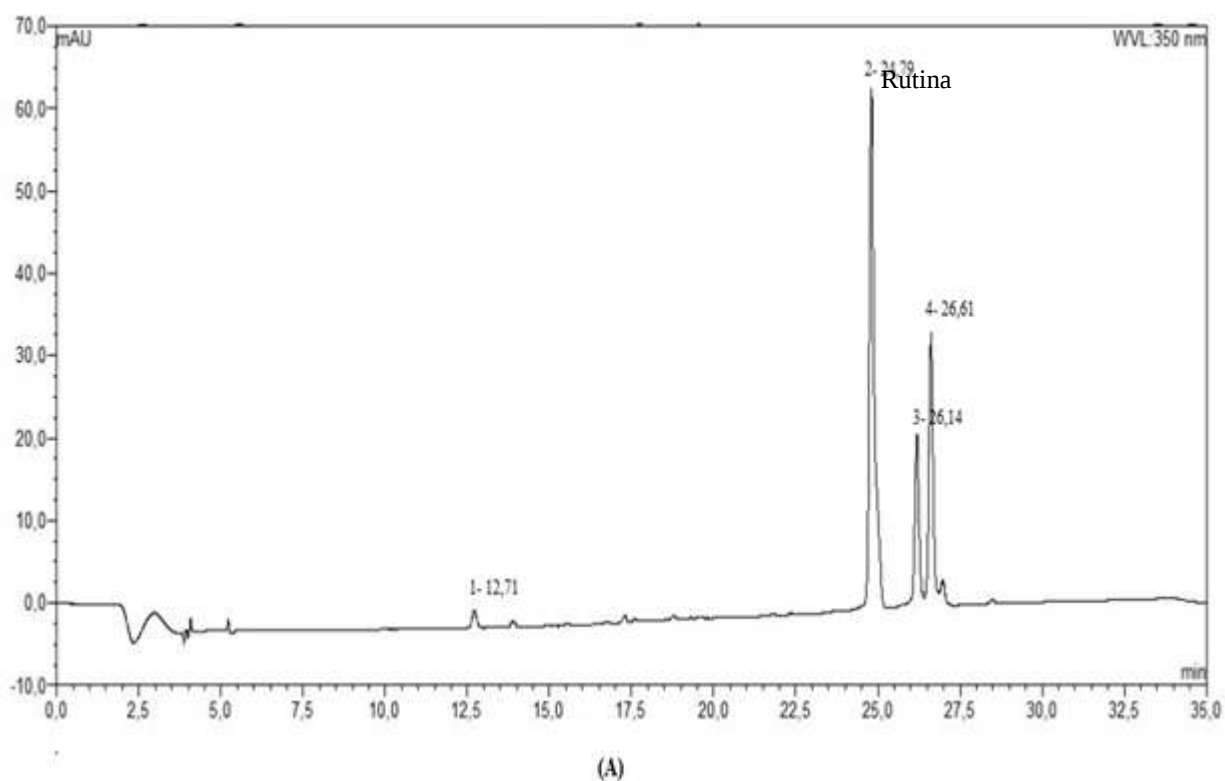
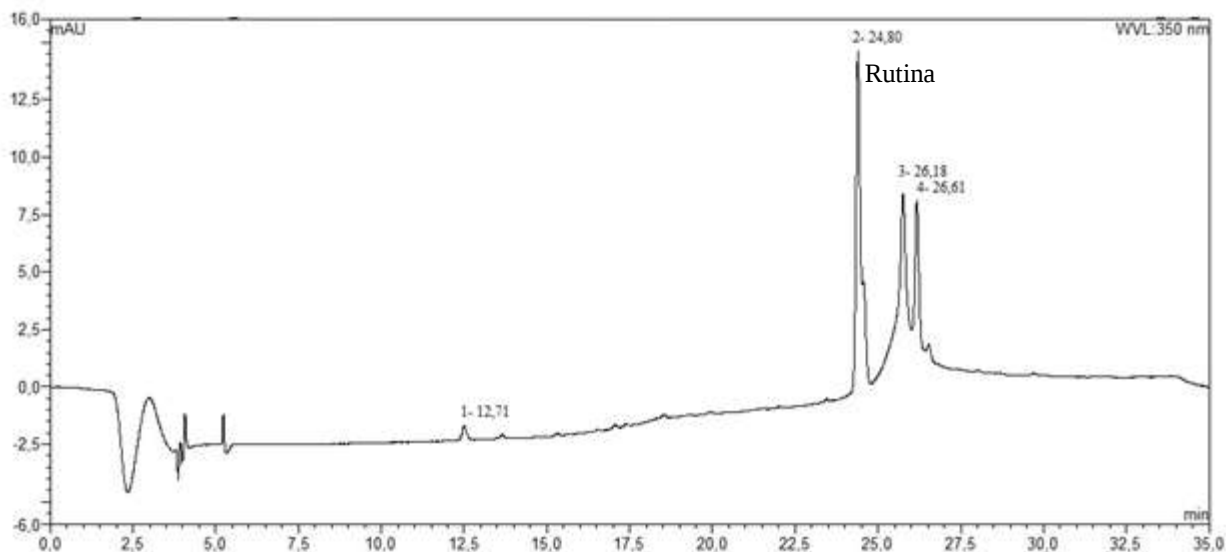
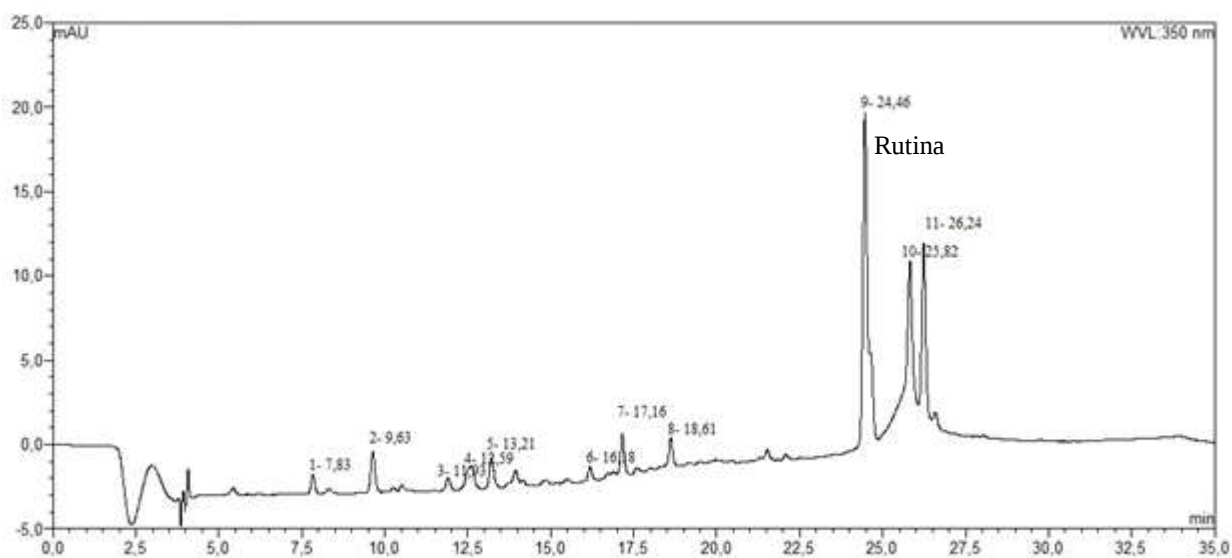


Figura 27- Resultados da CLAE para os extratos obtidos na extração das folhas de graviola por (A) ultrassom e (B) água subcrítica.

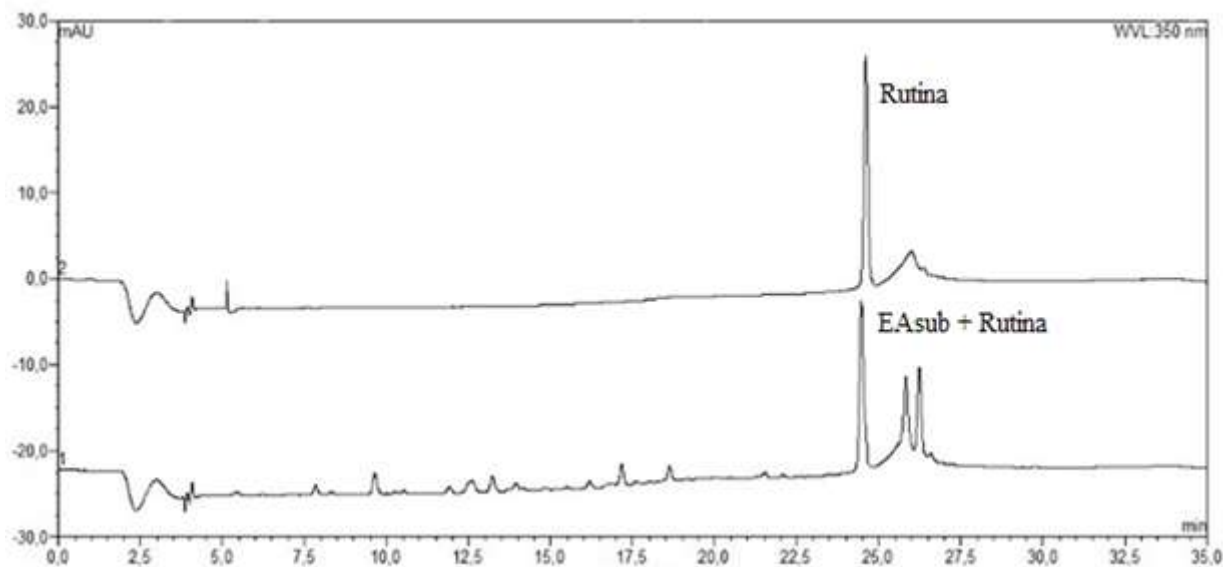


(A)



(B)

Dentre os picos obtidos, foi possível identificar o flavonoide rutina, através das análises dos cromatogramas comparando a EASub para as folhas de graviola com o padrão rutina (Figura 28). Os teores de rutina foram calculados com base nas áreas referentes ao pico correspondente presente nas amostras (Tabela 9).

Figura 28- Cromatograma para o padrão rutina em comparação com a EAsub contaminada com rutina.**Tabela 9.** Valores obtidos para a rutina por CLAE e correlação de Pearson.

Método de extração	Área	Teor médio de rutina (g)	DP*	DPPH
Sohxlet	6,3887	0,130	0,0003	-0,805
	6,3778			
	6,3567			
Infusão	3,1226	0,070	0,0002	0,092
	3,1345			
	3,1456			
Ultrassom	2,6752	0,062	0,0001	-0,835
	2,6667			
	2,6679			
Água Subcrítica (4 g/150 °C/225 bar)	3,2055	0,072	0,0003	0,441
	3,2306			
	3,2313			

* – Desvio padrão

Estudos demonstram que os flavonoides (especialmente flavonas e flavonóis, como rutina) têm sido associados à proteção anti-rajões UV-B. Essa é a provável explicação de suas altas concentrações nas folhas, atuando na proteção celular das organelas responsáveis pela

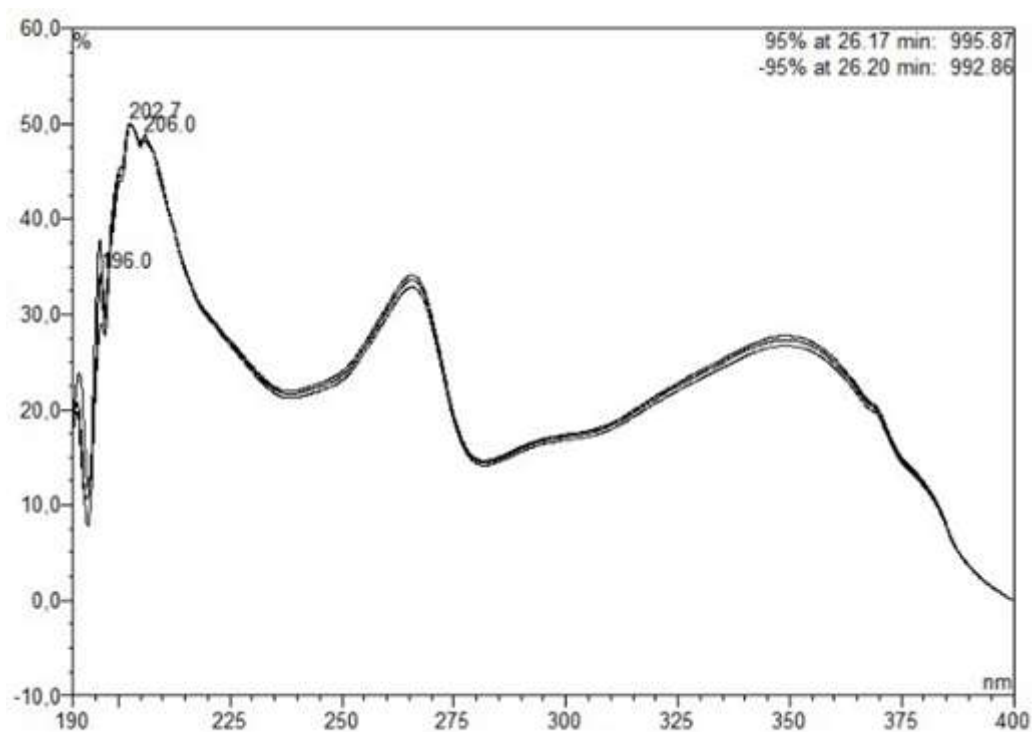
fotossíntese. Além disso, os flavonoides também podem atuar nas defesas contra insetos e patógenos (SANTOS; SALATINO, 2000).

Como visto na Tabela 9, é possível correlacionar o teor de rutina com as atividades antioxidantes totais (DPPH e ABTS) pelo método de Pearson. Apesar da atividade antioxidante não ser dependente apenas da rutina, outros compostos fenólicos podem estar presentes nos extratos em pequenas concentrações. Entretanto, a presença da rutina em maiores concentrações pode ser relacionada diretamente com a atividade antioxidante dos extratos obtidos. A rutina (vitamina P) é um bioflavonoide que apresenta uma estrutura química (Figura 6) com um dissacarídeo (raminose + glicose) ligados à posição 3 do anel pirano (GHORBANI, 2017).

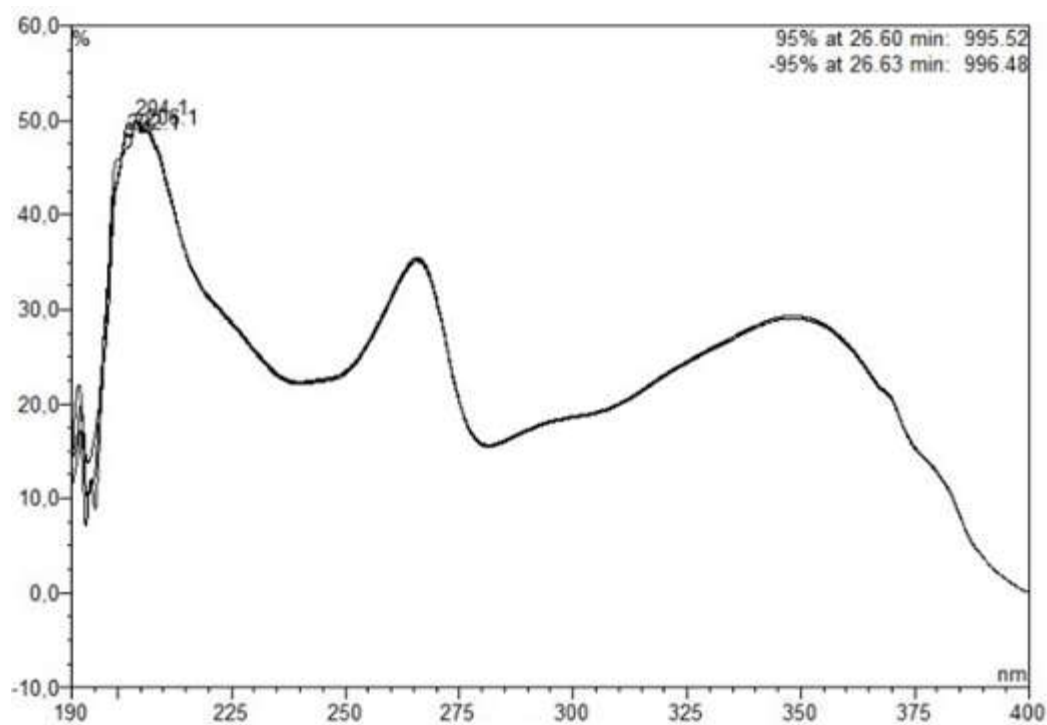
A análise da correlação dos coeficientes foi estabelecida para determinar a influência da rutina na atividade antioxidante pelo método DPPH dos extratos fenólicos das folhas de graviola. No caso, a rutina apresentou uma correlação antagônica forte para os extratos obtidos por Soxhlet e ultrassom, o que significa que, com a elevação da concentração de rutina, menor será o valor de EC_{50} , indicando uma alta atividade antioxidante do extrato. Para os extratos obtidos com água subcrítica, obteve-se apenas uma relação fraca. Resultados semelhantes foram observados por Arruda *et al.* (2018) em seus estudos com partes da fruta araticum (*A. crassiflora* Mart.), demonstrando uma forte correlação da rutina com as atividades antioxidantes pelos métodos DPPH e ABTS. Além do mais, relataram a influência de outros compostos fenólicos tão importantes quanto a rutina, como a catequina e o ácido protocatequínico, na determinação da atividade antioxidante dos extratos.

As Figuras 29, 30 e 31 correspondem aos espectros de varredura UV dos compostos encontrados nos extratos das folhas de graviola obtidos com uso de água subcrítica. Os picos avaliados estão enumerados e podem ser visualizados na Figura 27-B.

Figura 29- Espectros de varreduras para os picos (A) 3 e (B) 4 obtidos através de EASub.

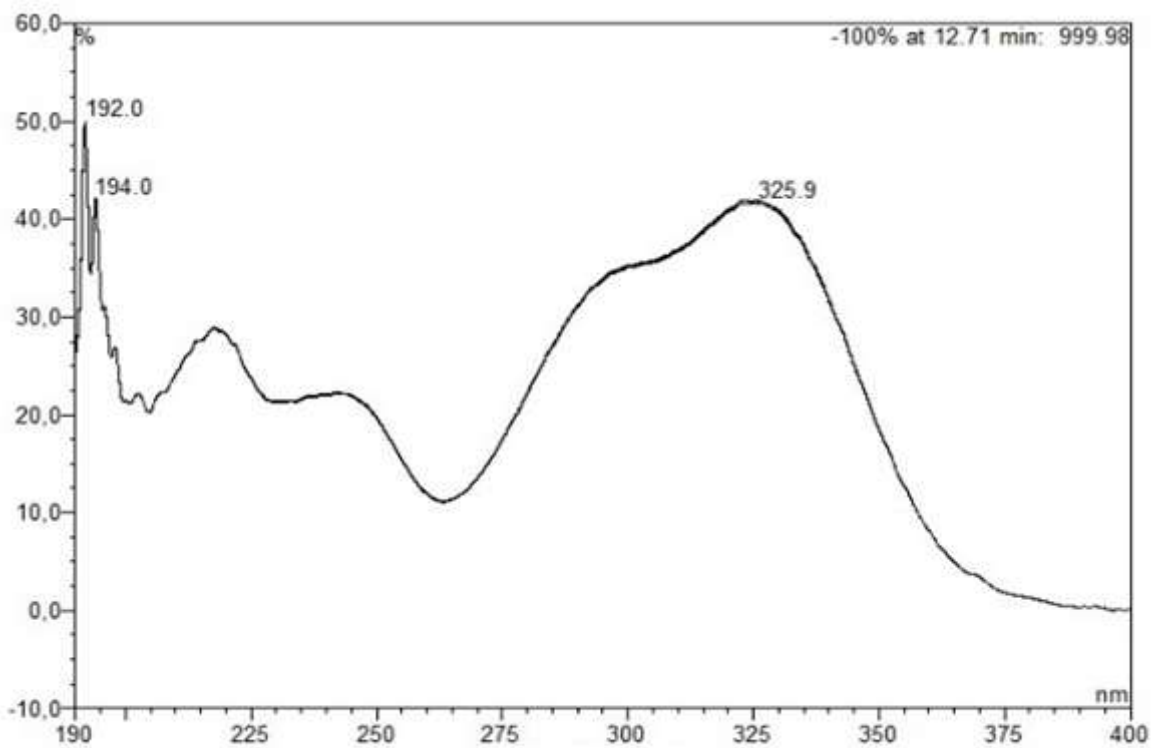


(A)

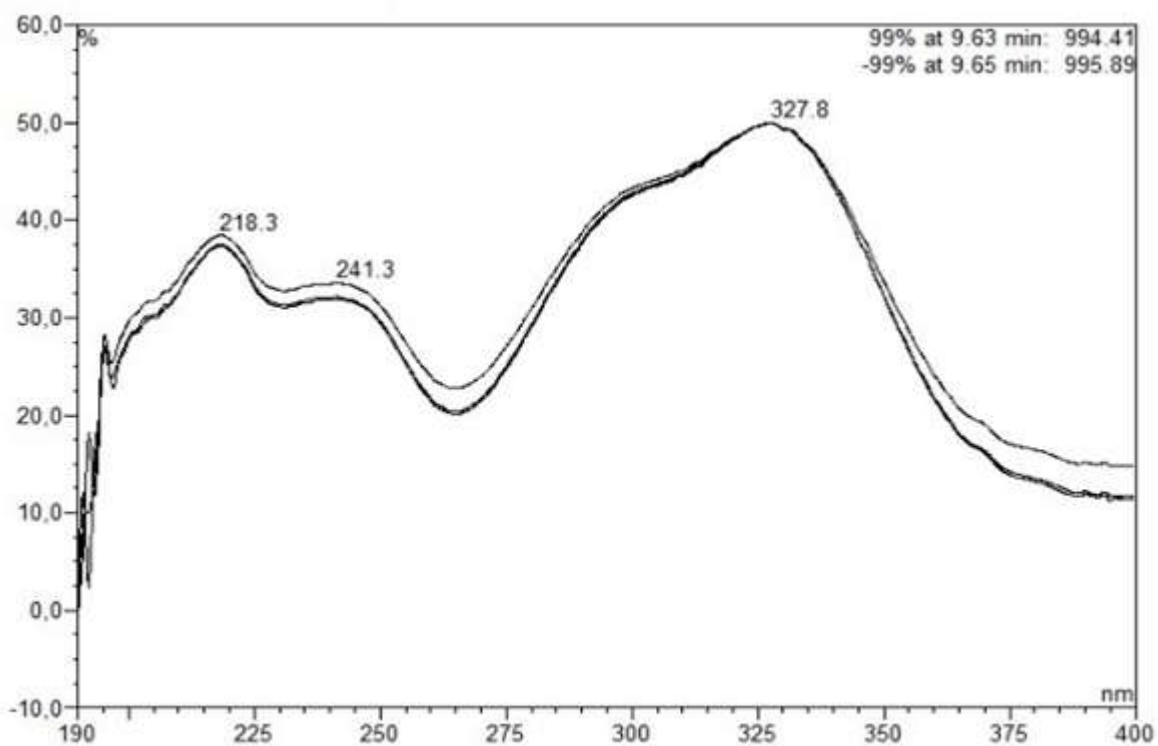


(B)

Figura 30- Espectros de varreduras para os picos (A) 1 e (B) 2 obtidos através de EASub.

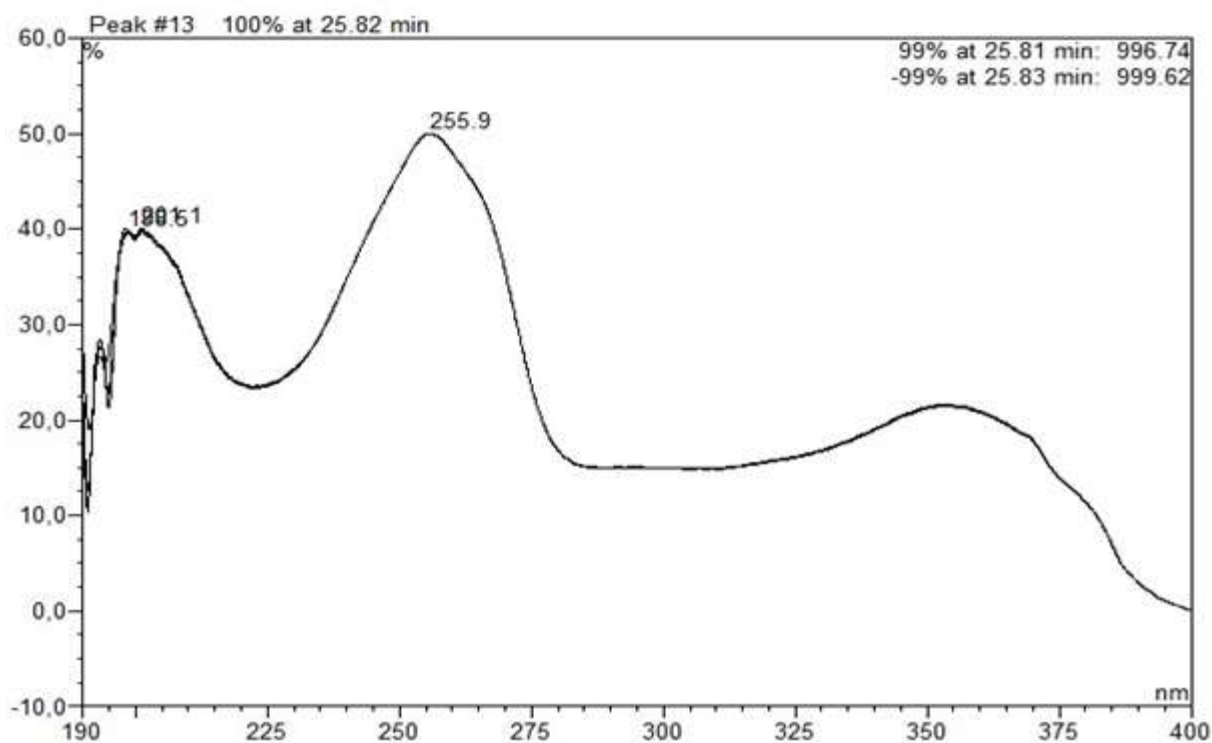


(A)



(B)

Figura 31- Espectro de varredura para o pico 10 obtido através de EASub.



Os compostos encontrados nos extratos de folhas de graviola obtidos por meio de extração com água subcrítica (Figura 27-B) apresentaram espectros UV semelhantes aos flavonoides (picos 3 e 4 da Figura 29; $\lambda_{\text{máx}}$ 206,0 e 206,1 nm, respectivamente). O mesmo foi observado com relação aos derivados cinâmicos, representados pelos espectros dos picos 1 e 2 (Figura 30; $\lambda_{\text{máx}}$ 325,9 e 327,8 nm, respectivamente). Adicionalmente, o espectro referente ao pico 10 (Figura 31; $\lambda_{\text{máx}}$ 255,9 nm), possivelmente corresponde ao ácido elágico. Isto está de acordo com o fato de que vários derivados cinâmicos e flavonoides, assim como o ácido elágico, foram relatados anteriormente em espécies do gênero *Annona* (SARKER; LATIF; GRAY, 2005).

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1 Conclusões

A identificação e quantificação de compostos bioativos dos extratos investigados neste trabalho se mostraram eficazes para as folhas de graviola utilizando diferentes métodos de extração (ES, EI, EU, EASub). Não foi evidenciada a presença de compostos fenólicos nos extratos de sementes de graviola para os vários métodos de extração empregados.

Foi demonstrado neste trabalho que alterações nos parâmetros de processo de extração com água subcrítica (EASub) proporcionam a otimização do método, uma vez que interferem nas características do solvente empregado.

O método convencional de extração Soxhlet (ES) utilizando folhas de graviola como matéria-prima e etanol como solvente atingiu melhores resultados na quantificação de compostos fenólicos pelos métodos de Folin-Ciocalteu. Entretanto, o método de extração com maior número de picos obtidos nas análises de CLAE foi a EASub (11 picos).

Foi evidenciada a capacidade antioxidante para todos os extratos obtidos a partir de folhas de graviola pelos diferentes métodos de extração, destacando-se os extratos obtidos via ES, através de análises pelos métodos de eliminação de radicais livres (DPPH) e redução da propriedade de poder antioxidante (ABTS).

Assim, com os resultados obtidos nos estudos de determinação de atividade antioxidante, pode-se afirmar que o método de ES com etanol como solvente é o mais indicado para a obtenção de compostos fenólicos em relação aos outros métodos de extração aplicados neste trabalho para os extratos obtidos a partir de folhas de graviola.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Avaliar a atividade microbiana dos extratos obtidos de folhas de graviola pelos diferentes métodos de extração investigados pelo método de disco-difusão em ágar ou outros;

Deslocamento na otimização do processo de extração com água subcrítica, isto é, aumento das faixas de temperatura e pressão de operação, as quais sofreram limitações operacionais, além de trabalhar com vazões distintas de solvente (água);

Substituição do solvente utilizado nos métodos convencionais por mistura 70:30 (etanol:água, v/v), com intuito de maximizar a extração de compostos fenólicos;

Realizar avaliação econômica para viabilidade do processo de valorização dos resíduos agroindustriais empregando os métodos de extração investigados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- AKGÜL, G.; MADENÓGLU, T.G.; CENGİZ, N.U.; GÖKKAYA, D.; SÁGLAM, M.; YÜKSEL, M.; Hydrothermal gasification of *Rosa damascena* residues: Gaseous and aqueous yields. **Journal of Supercritical Fluids**. V. 85, p. 135–142, 2014.
- ALALI, F.Q.; XIAO-XI, L.; MCLAUGHLIN, J.L.; Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products**. V. 62, p. 504–540, 1999.
- ALIAKBARIAN, B.; FATHI, A.; PEREGO, P.; DEHGHANI, F.; Extraction of antioxidants from winery wastes using subcritical water. **Journal of Supercritical Fluids**. V. 65, p. 18–24, 2012.
- ALBUQUERQUE, B.R.; PRIETO, M.A.; BARREIRO, M.F.; RODRIGUES, A.; CURRAN, T.P.; BARROS, L.; FERREIRA, I.C.F.R.; Catechin-based extract optimization obtained from *Arbutus unedo* L. fruits using maceration/microwave/ultrasound extraction techniques. **Industrial Crops and Products**. V. 95, p. 404-415, 2016.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M.; Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**. V. 33, N. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ARRUDA, H.S.; PEREIRA, G.A.; MORAIS, D.R.; EBERLIN, M.N.; PASTORE, G.M.; Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. **Food Chemistry**. V. 245, p. 738–749, 2018.
- BARATA, L.E.S.; ALENCAR, A.A.J.; TASCONE, M.; TAMASHIRO, J.; Plantas medicinais brasileiras. IV. *Annona muricata* L. (Graviola). **Revista Fitos**. V. 4, N. 1, p. 132-138, 2009.
- BARRETO, F.S.; Estudo da atividade citotóxica de compostos obtidos do extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* L. por fracionamento bioguiado. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Ceará, CE, 2014.

BASTOS, D.H.M.; ROGERO, M.M.; AREAS, J.A.G.; Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. V. 53, N. 5, p. 646-656, 2009.

BARBOSA, H.M.A.; Optimization of the supercritical fluid coextraction of oil and diterpenes from spent coffee grounds using experimental design and response surface methodology. **Journal of Supercritical Fluids**. V. 85, p. 165–172, 2014.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**. V. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Boletim de Inteligência: Agronegócio – fruticultura. 2015. Disponível em: <[http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/64ab878c176e5103877bfd3f92a2a68f/\\$File/5791.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/64ab878c176e5103877bfd3f92a2a68f/$File/5791.pdf)>. Acesso em 31 de dezembro de 2017.

BRUNNER, G.; Near critical and supercritical water. Part I. Hydrolytic and hydrothermal processes. **Journal of Supercritical Fluids**. V. 47, p. 373–381, 2009a.

BRUNNER, G.; Near critical and supercritical water. Part II. oxidative processes. **Journal of Supercritical Fluids**. V. 47, p. 382–390, 2009b.

BUDRAT, P.; SHOTIPRUK, A.; Enhanced recovery of phenolic compounds from bitter melon (*Momordica charantia*) by subcritical water extraction. **Separation and Purification Technology**. V. 66, p. 125–129, 2009.

CARVALHO, C.; KIST, B.B.; SANTOS, C.E.; TREICHEL, M.; FILTER, C.F.; Anuário brasileiro da fruticultura 2017. **Editora Gazeta Santa Cruz**, 2017. Disponível em: <http://www.editoragazeta.com.br/wp-content/uploads/2017/03/PDF-Fruticultura_2017.pdf>. Acesso em 31 de dezembro de 2017.

CASTILLO-SÁNCHEZ, L.E.; JIMÉNEZ-OSORNIO, J.J.; DELGADO-HERRERA, M.; Secondary metabolites of the Annonaceae, solanaceae and meliaceae families used as biological control of insects. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**. V. 12, p. 445–462, 2010.

CASTRO, M.D.L.; PRIEGO-CAPOTE, F.; Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**. V. 1217, N. 16, p. 2383–2389, 2010.

CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A.; MEULLEMIESTRE, A.; FABIANO-TIXIER, A.; ABERT-VIAN, M.; Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**. V. 34, p. 540–560, 2017.

CHEN, S.-Y.; URBAN, P.L.; On-line monitoring of Soxhlet extraction by chromatography and mass spectrometry to reveal temporal extract profiles. **Analytica Chimica Acta**. V. 881, p. 74–81, 2015.

CORIA-TÉLLEZ, A.V.; MONTALVO-GÓNZALEZ, E.; YAHIA, E.M.; OBLEDO-VÁZQUEZ, E.N.; *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. **Arabian Journal of Chemistry**. V. 11, N. 5, p. 662–691, 2018.

CORREA-GORDILLO, J.; ORTIZ, J.; SÁNCHEZ-MEJÍA, M.; PACHÓN, H.; Actividad antioxidante en guanábana (*Annona muricata* L.) una revisión bibliográfica. **Latin American and Caribbean Bulletin of Medicinal and Aromatic Plants**. V. 11, p. 111–126, 2012.

COSTA, D.O.; CARDOSO, G.R.; SILVA, G.M.V.; A evolução do setor produtivo e comercialização de polpa de fruta no brejo paraibano: estudo de caso na coaprodes. **XXXIII Encontro Nacional de Engenharia de Produção**. p. 16, 2013.

CRUZ, L.S.; Caracterização física e química da casca, polpa e semente de Atemoia “gefner”. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Lavras, MG, 2011.

CRUZ, P.N.; PEREIRA, T.C.S.; GUINDANI, C.; OLIVEIRA, D.A.; ROSSI, M.J.; FERREIRA, S.R.S.; Antioxidant and antibacterial potential of butia (*Butia catarinensis*) seed extracts obtained by supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**. V. 119, p. 229–237, 2017.

DOMINGUES, R.M.A.; MELO, M.M.R.; OLIVEIRA, E.L.G.; NETO, C.P.; SILVESTRE, A.J.D.; SILVA, C.M.; Optimization of the supercritical fluid extraction of triterpenic acids from

Eucalyptus globulus bark using experimental design. **Journal of Supercritical Fluids**. V. 74, p. 105–114, 2013.

DONCHEVA, D.; BRUNNER, G.; Cleaning of animal-derived bone material for implantation by combined extraction/reaction process of organic matrix with subcritical water and characterisation of hydrolysates. **Proceedings of Fifth International Symposium on High Pressure Process Technology and Chemical Engineering**, p. 24-27, 2007.

EIKANI, M.H.; GOLMOHAMMAD, F.; ROWSHANZAMIR, S.; Subcritical water extraction of essential oils from coriander seeds (*Coriandrum sativum* L.). **Journal of Food Engineering**. V. 80, p. 735–740, 2007.

FERREIRA, M.; SOARES, L.; Protocolo de análises externas. Laboratório de farmacognosia – UFPE, 2017.

FOFANA, S.; KEITA, A.; BALDE, S.; ZIYAEV, R.; ARIPOVA, F.; Alkaloids from leaves of *Annona muricata*. **Chemistry of Natural Compounds**. V. 48, N. 4, p. 714, 2012.

FOFANA, S.; ZIYAEV, R.; ABDUSAMATOV, A.; ZAKIROV, S.K.; Alkaloids from *Annona muricata* leaves. **Chemistry of Natural Compounds**. V. 47, p. 321, 2011.

FOLIN, C.; CIOCALTEU, V. Tyrosine and tryptophan determination in protein. **Journal of Biological Chemistry**. V. 73, p. 627-650, 1927.

FORNARI, T.; VICENTE, G.; VÁZQUEZ, E.; GARCÍA-RISCO, M.R.; REGLERO, G.; Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. **Journal of Chromatography A**. V. 1250, p. 34–48, 2012.

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

GEORGE, V.C.; KUMAR, D.R.; RAJKUMAR, V.; SURESH, P.K.; ASHOK, K.; Quantitative assessment of the relative antineoplastic potential of the n-butanolic leaf extract of *Annona*

muricata Linn. in normal and immortalized human cell lines. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. V. 13, p. 699–704, 2012.

GEORGE, V.C.; KUMAR, D.R.N.; SURESH, P.K.; KUMAR, R.A.; Antioxidant, DNA protective efficacy and HPLC analysis of *Annona muricata* (soursop) extracts. **Journal Food Science and Technology**. V. 52, N. 4, p. 2328–2335, 2015.

GHORBANI, A.; Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. V. 96, p. 305–312, 2017.

GLASER R; BROWN JS; LIOTTA CL; ECKERT C.A.; Base-catalyzed reactions in near-critical water for environmentally benign chemical processing. **Chemistry of Renewable Fuels and Chemicals**. V. 44, p. 385–388, 1999.

HASRAT, J.A.; BRUYNE, T.; BACKER, J.; VAUQUELIN, G. VLIETINCK, A.J.; Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HTergic 5-HT1A receptor agonists in rats: unexploited antidepressive (lead) products. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. V. 49, p. 1145–1149, 1997.

HASSAS-ROUDSARI, M.; CHANG, P.R.; PEGG, R.B.; TYLER, R.T.; Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanolic and hot water extraction. **Food Chemistry**. V. 114, p. 717–726, 2009.

HE, L.; ZHANG, X.; XU, H.; XU, C.; YUAN, F.; KNEZ, Z.; NOVAK, Z.; GAO, Y.; Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC–ABTS^{•+} assay. **Food and Bioproducts Processing**. V. 90, p. 215–223, 2012.

HELENO, S.A.; DIZ, P.; PRIETO, M.A.; BARROS, L.; RODRIGUES, A.; BARREIRO, M.F.; FERREIRA, I.C.F.R.; Optimization of ultrasound-assisted extraction to obtain mycosterols from *Agaricus bisporus* L. by response surface methodology and comparison with conventional Soxhlet extraction. **Food Chemistry**. V. 197 (B), p. 1054–1063, 2015.

HRABOVSKI, N.; SINADINOVIC-FISER, S.; NIKOLOVSKI, B.; SOVILJ, B.; BOROTA, O.; Phytosterols in pumpkin seed oil extracted by organic solvents and supercritical CO₂. **European Journal of Lipid Science and Technology**. V. 114, p. 1204–1211, 2012.

JIMÉNEZ, V.M.; GRUSCHWITZ, M.; SCHWEIGGERT, R.M.; CARLE, R.; ESQUIVEL, P.; Identification of phenolic compounds in soursop (*Annona muricata*) pulp by high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization mass spectrometric detection. **Food Research International**. V. 65 (A), p. 42-46, 2014.

KALIDINDI, N.; THIMMAIAH, N.V.; JAGADEESH, N.V.; NANDEEP, R.; SWETHA, S.; KALIDINDI, B.; Antifungal and antioxidant activities of organic and aqueous extracts of *Annona squamosa* Linn. leaves. **Journal of Food and Drug Analysis**. V. 23, p. 795-802, 2015.

KNEZ, Z.; Enzymatic reactions in subcritical and supercritical fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**. V. 134, p. 133-140, 2018.

KO, Y.M.; WU, T.Y.; WU, Y.C.; CHANG, F.R.; GUH, J.Y.; CHUANG, L. Y.; Annonacin induces cell cycle-dependent growth arrest and apoptosis in estrogen receptor-alfa-related pathways in MCF-7 cells. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 137, p. 1283–1290, 2011.

KRONHOLM, J.; KALPALA, J.; HARTONEN, K.; RIEKKOLA, M.; Pressurized hot water extraction coupled with supercritical water oxidation in remediation of sand and soil containing PAHs. **Journal Supercritical Fluids**. V. 23, p. 123–134, 2002.

KUBATOVA, A.; JANSEN, B.; VAUDOISOT, J.; HAWTHORNE, S.B.; Thermodynamic and kinetic models for the extraction of essential oil from savory and polycyclic aromatic hydrocarbons from soil with hot (subcritical) water and supercritical CO₂. **Journal Chromatography A**. V. 975, N. 1, p. 175-188, 2002.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R.; Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V. 25, N. 4, p. 726-732, 2006.

LEBOEUF, M.; LEGUEUT, C.; CAVÉ, A.; DESCONCLOIS, J.F.; FARGACS, P.; JACQUEMIN, H.; Alkaloids of Annonaceae XXIX. Alkaloids of *Annona muricata*. **Journal of Medicinal Plants Research**. V. 42, p. 37–44, 1981.

LUNA, J.S.; *Estudo de plantas bioativas*. 2006. 233 f. **Tese (Doutorado em Química Fundamental)** – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

MAGALHÃES, L.M.; SEGUNDO, M.A.; REIS, S.; LIMA, J.L.F.C.; Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**. V. 613, p. 1–19, 2008.

MASON, T.J.; TIEHM, A.; *Advances in Sonochemistry: Ultrasound in Environmental Protection*. Ed. **JAI Press**. V. 6, p. 1–284, 2001.

MAYANGA-TORRES, P.C.; LACHOS-PEREZ, D.; REZENDE, C.A.; PRADO, J.M.; MA, Z.; TOMPSETT, G.T.; TIMKO, M.T.; FORSTER-CARNEIRO, T.; Valorization of coffee industry residues by subcritical water hydrolysis: Recovery of sugars and phenolic compounds. **Journal of Supercritical Fluids**. V. 120, p. 75–85, 2017.

MAZZUTTI, S.; RIEHL, C.A.S.; IBAÑEZ, E.; FERREIRA, S.R.S.; Green-based methods to obtain bioactive extracts from *Plantago major* and *Plantago lanceolata*. **Journal of Supercritical Fluids**. V. 119, p. 211–220, 2017.

MEZZOMO, N.; MILEO, B.R.; FRIEDRICH, M.T.; MARTINEZ, J.; FERREIRA, S.R.S.; Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: process yield and extract composition. **Bioresource Technology**. V. 101, p. 5622–5632, 2010.

MICHIELIN, E.M.Z.; WIESE, L.P.L.; FERREIRA, E.A.; PEDROSA, R.C.; Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Journal of Supercritical Fluids**. V. 56, p. 89–96, 2011.

MOHANTY, S.; HOLLINSHEAD, J.; JONES, L.; JONES, P.W.; THOMAS, D.; WATSON, A.A.; WATSON, D.G.; GRAY, A.I.; MOLYNEUX, R.J.; NASH, R.J.; *Annona muricata* (Graviola): toxic or therapeutic. **Natural Product Communications**. V. 2, p. 31–33, 2008.

MORAES, I.V.M.; RIBEIRO, P.R.V.; SCHMIDT, F.L.; CANUTO, K.M.; ZOCCOLO, G.J.; BRITO, E.S.; LUO, R.; RICHARDS, K.M.; TRAN, K.; SMITH, R.E.; UPLC–QTOF–MS and NMR analyses of graviola (*Annona muricata*) leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 26, p. 174–179, 2016.

NAKANISHI, Y.; CHANG, F.R.; LIAW, C.C.; WU, Y.C.; BASTOW, K.F.; LEE, K.H.; Acetogenins as selective inhibitors of the human ovarian 1A9 tumor cell line. **Journal of Medicinal Chemistry**. V. 46, p. 3185–3188, 2003.

NAKAJIMA, H.; Mass transfer advances in sustainable energy and environment oriented numerical modelling. INTECH, 2013.

NASTIĆ, N.; ŠVARC-GAJIĆ, J.; DELERUE-MATOS, C.; BARROSO, M.F.; SOARES, C.; MOREIRA, M.M.; MORAIS, S.; MAŠKOVIĆ, P.; SRČEK, V.G.; SLIVAC, I.; RADOŠEVIĆ, K.; RADOJKOVIĆ, M.; Subcritical water extraction as an environmentally-friendly technique to recover bioactive compounds from traditional Serbian medicinal plants. **Industrial Crops & Products**. V. 111, p. 579–589, 2018.

NAWWAR, M.; AYOUB, N.; HUSSEIN, S.; HASHIM, A.; EL-SHARAWY, R.; WENDE, K.; HARMS, M.; LINDEQUIST, U.; A flavonol triglycoside and investigation of the antioxidante and cell stimulating activities of *Annona muricata* Linn. **Archives of Pharmacal Research**. V. 35, p. 761–767, 2012.

NOBRE, B.P.; PALAVRA, A.F.; PESSOA, F.L.P.; MENDES, R.L.; Supercritical CO₂ extraction of trans-lycopene from Portuguese tomato industrial waste. **Food Chemistry**. V. 116, p. 680–685, 2009.

OLIVEIRA, D.A.; ANGONESE, M.; GOMES, C.; FERREIRA, S.R.S.; Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: Sustainable recovery and biological activities. **Journal of Supercritical Fluids**. V. 111, p. 55–62, 2016.

OZEL, M.Z.; GOGUS, F.; LEWIS, A.C.; Subcritical water extraction of essential oils from *Thymbra spicata*. **Food Chemistry**. V. 82, p. 381–386, 2003.

PAES, M.M.; VEGA, M.R.G.; CORTES, D.; KANASHIRO, M.M.; Potencial citotóxico das acetogeninas do gênero *Annona*. **Revista Virtual Química**. V. 8, N. 3, p. 945-980, 2016.

PASSOS, A.; Produção em crescimento. **Revista safra**. 2017. Disponível em: <<http://revistasafra.com.br/producao-em-crescimento/>> Acesso em 31 de dezembro de 2017.

PRADO, J.M.; FOLLEGATTI-ROMERO, L.A.; FORSTER-CARNEIRO, T.; ROSTAGNO, M.A.; MAUGERI FILHO, F.; MEIRELES, M.A.A.; Hydrolysis of sugarcane bagasse in subcritical water. **Journal of Supercritical Fluids**. V. 86, p. 15– 22, 2014.

PICÓ, Y.; Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**. V. 43, p. 84-99, 2013.

PREEDY, V.; WATSON, R.R.; PATEL, V.B.; Nuts and seeds in health and disease prevention. ELSEVIER, Cambridge, UK, 2011.

RAGASA, A.Y.; SORIANO, G., TORRES, G.B.; DON, M.; SHEN, C.; Acetogenins from *Annona muricata*. **Pharmacognosy Journal**. V. 32, p. 32–37, 2012.

ROSTAGNO, M. A.; PRADO, J. M. Natural Product Extraction: Principles and Applications. RSC PUBLISHING, Cambridge, UK, 2013.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D.; Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa**, 2007a. Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/Cot_127.pdf>. Acesso em 02 de janeiro de 2018

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D.; Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{•+}. **Embrapa**, 2007b. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/426954/1/Cot128.pdf>>. Acesso em 02 de janeiro de 2018

SANTOS, D.Y.A.C.; Botânica aplicada: metabólitos secundários na interação planta-ambiente. 2014, 124 f. **Tese (Doutorado em Botânica)** – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

SANTOS, D.Y.A.C.; SALATINO, M.L.F.; Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**. V. 55, p. 567-573, 2000.

SANTOS, L.G.; Métodos de difusão radial: validação e otimização do processo de extração para doseamento de taninos de espécies medicinais da caatinga. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Pernambuco, PE, 2012.

SANTOS, M.K.K.; ENSINAS, S.C.; RIZZATO, M.C.O.; REGINATO, M.P.; Atividade antioxidante da *Annona muricata* L. Anais do ENEPEX, 2014. Disponível em: <<https://anaisonline.uems.br/index.php/egrad/article/download/639/645>>. Acessado em 06 de janeiro de 2018.

SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. Natural Products Isolation. 2ª Ed., p. 529, Human Press, 2005.

SEREEWATTHANAWUT, I.; PRAPINTIP, S.; WATCHIRARUJI, K.; GOTO, M.; SASAKI, M.; SHOTIPRUK, A.; Extraction of protein and amino acids from deoiled rice bran by subcritical water hydrolysis. **Bioresource Technology**. V. 99, p. 555–561, 2008.

SILVA, A.C.M.; Base de dados de alimentos funcionais e seus constituintes químicos. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2008.

SILVA, F.R.; ANTUNES, R.M.P.; CATÃO, R.M.R.; Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de *Annona muricata* L. (Annonaceae). **Revista de Biologia e Farmácia**. V. 06, N. 2, p. 27-36, 2011.

SILVA, L.M.; NEPOMUCENO, J.C.; Efeito modulador da polpa da graviola (*Annona muricata*) sobre a carcinogenicidade da mitomicina C, avaliado por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em *Drosophila melanogaster*. **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão**. V. 1, N. 8, p. 80-94, 2011.

SILVEIRA, A.L.C.; Validação de métodos para a determinação de compostos fenólicos em melancia. **Dissertação de Mestrado**, Instituto Politécnico de Castelo Branco. 2013.

SIQUEIRA, A.M.O.; MOREIRA, A.C.C.G.; MELO, E.A.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, T.L.M.; Dietary fibre content, phenolic compounds and antioxidant activity in soursops (*Annona muricata* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. V. 37, N. 4, p. 1020-1026, 2015.

SODEIFIAN, G.; SAJADIAN, S.A.; ARDESTANI, N.A.; Extraction of *Dracocephalum kotschy* Boiss using supercritical carbon dioxide: Experimental and optimization. **Journal of Supercritical Fluids**. V. 107, p. 137–144, 2016.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR., G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H.; Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. V. 30, N. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, M.S.B.; VIEIRA, L.M.; LIMA, A.; Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal Food Technology**. V. 14, N. 3, p. 202-210, 2011.

SUCUPIRA, N.R.; SILVA, A.B.; PEREIRA, G.; COSTA, J.N.; Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **Journal of Health Sciences**. V. 14, N. 4, p. 263-269, 2012.

SUN, S.; LIU, J.; KADOUH, H. SUN, X.; ZHOU, K.; Three new anti-proliferative Annonaceous acetogenins with mono-tetrahydrofuran ring from graviola fruit (*Annona muricata*). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. V. 24, N. 12, p. 2773–2776, 2014.

SUN, S.; LIU, J.; Zhou, N.; Zhu, W.; DOU, Q.P.; ZHOU, K.; Isolation of Three New Annonaceous Acetogenins from Graviola Fruit (*Annona muricata*) and their Anti-Proliferation on Human Prostate Cancer Cell PC-3. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. V. 26, N. 17, p. 4382-4385, 2016.

TEIXEIRA, F.A.; *DPPH*. **Sociedade Brasileira de Química**. 2018. Disponível em: <http://qnint.sbq.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=4J4NcOscwSWQozPv_U900znaL

VcJT9yuEtosdRR6-OUaLje9-zD1r0zo9HWlFgxKcELr89FjeGeQhTJYPGT2Q> Acesso em 17 de janeiro de 2018

TOLDRÁ, F.; *Advances in Food and Nutrition Research*. ELSEVIER, Cambridge, UK, V. 82 2017.

THIRUVENKADAM, S.; IZHAR, S.; YOSHIDA, H.; DANQUAH, M.K.; HARUN, R.; Process application of Subcritical Water Extraction (SWE) for algal bio-products and biofuels production. **Applied Energy**. V. 154, p. 815–828, 2015.

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

UENO, H.; TANAKA, M.; HOSINO, M.; SASAKI, M.; GOTO, M.; Extraction of valuable compounds from the flavedo of *Citrus junos* using subcritical water. **Separation and Purification Technology**. V. 62, p. 513–516, 2008.

Ultrasound and infrasound. **BBC Science**. 2014. Disponível em: <http://www.bbc.co.uk/schools/gcsebitesize/science/edexcel/waves_earth/ultrasound_infrasoundrev1.shtml>. Acesso em 04 de janeiro de 2018.

WANG, L.; WELLER, C. L.; Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**. V. 17, N. 6, p. 300–312, 2006.

WATSON, R.R.; PREEDY, V.; *Bioactive Foods in Promoting Health: Fruits and Vegetables*. ELSEVIER, Cambridge, UK, 2010.