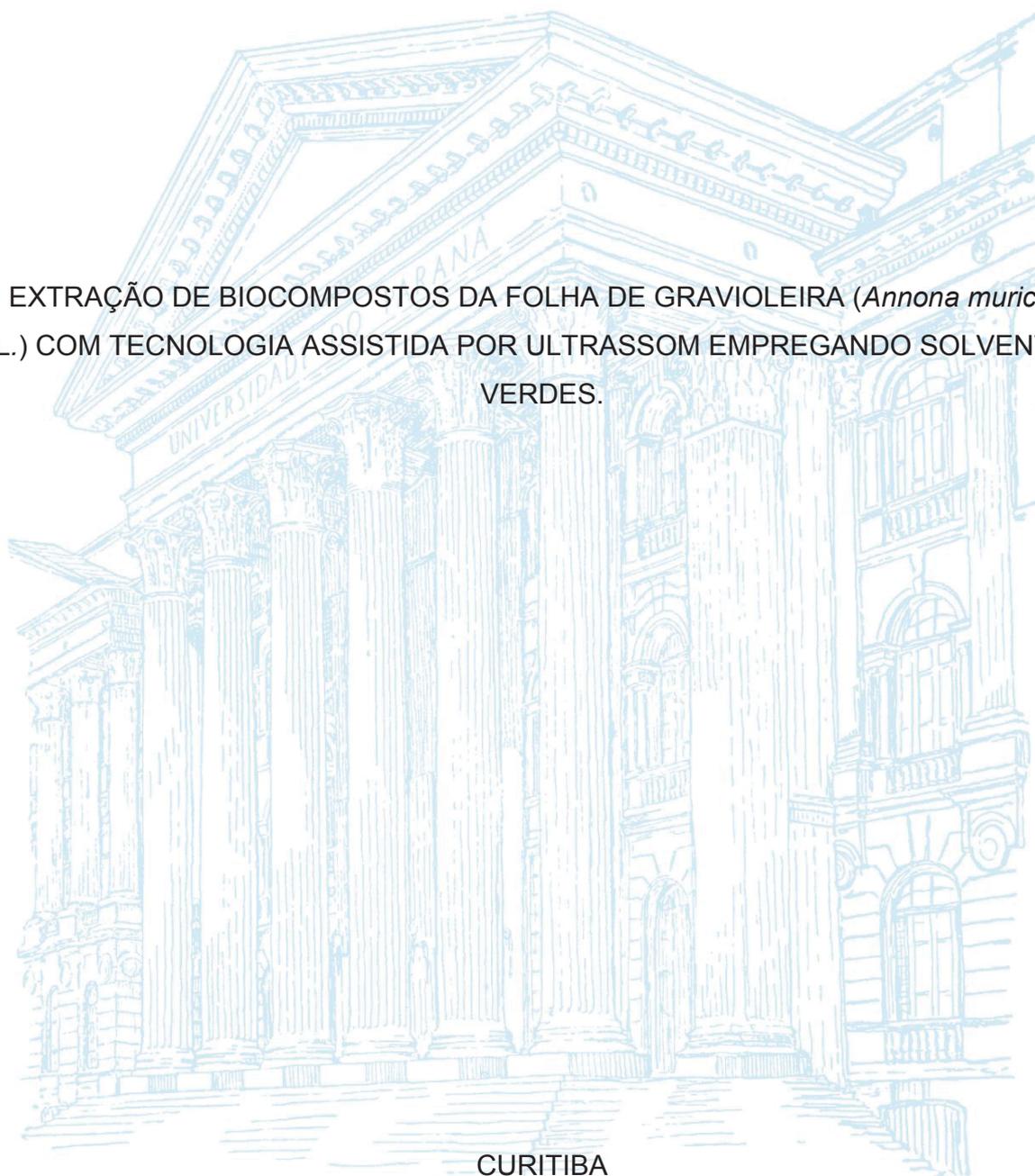


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDO CASTRO LEAL

EXTRAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS DA FOLHA DE GRAVIOLEIRA (*Annona muricata*
L.) COM TECNOLOGIA ASSISTIDA POR ULTRASSOM EMPREGANDO SOLVENTES
VERDES.



CURITIBA

2020

FERNANDO CASTRO LEAL

EXTRAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS DA FOLHA DE GRAVIOLEIRA (*Annona muricata*
L.) COM TECNOLOGIA ASSISTIDA POR ULTRASSOM EMPREGANDO SOLVENTES
VERDES.

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciana Igarashi Mafra
Coorientadora: Dr.^a Fabiane Oliveira Farias

CURITIBA
2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE – SIBI/UFPR

L435e Leal, Fernando Castro

Extração de biocompostos da folha de gravioleira (*annona muricata* L.) com tecnologia assistida por ultrassom empregando solventes verdes [recurso eletrônico/ Fernando Castro Leal. Curitiba, 2020.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciana Igarashi Mafra
Coorientadora: Dr.^a Fabiane Oliveira Farias

1. Antioxidantes. 2. Alimentos. I. Mafra, Luciana Igarashi. II. Farias, Fabiane Oliveira. I. Título.

CDD 664.07

Bibliotecária: Vilma Machado CRB9/1563



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
ALIMENTOS - 40001016019P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **FERNANDO CASTRO LEAL** intitulada: **Extração de Biocompostos da Folha de Gravioleira (*Annona muricata L.*) com Tecnologia Assistida por Ultrassom Empregando Solventes Verdes.**, sob orientação da Profa. Dra. LUCIANA IGARASHI MAFRA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 09 de Março de 2020.


LUCIANA IGARASHI MAFRA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


MÁRIA LUCIA MASSON

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


ALINE ALBERTI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos e proteções concedidas durante toda a caminhada até aqui. Aos meus pais, Rita Maria de Oliveira Castro e Sirio Leal, todos meus irmãos, tios e tias no geral e minha namorada Larissa, pelo apoio e por acreditar no meu potencial.

A minha orientadora Professora Dr^a Luciana Igarashi Mafra e Co-orientadora Dr^a Fabiane Oliveira Farias e juntamente com o Professor Dr. Marcos R. Mafra pela paciência, dedicação, profissionalismo e confiança que tornaram a elaboração deste estudo possível, meus sinceros agradecimentos.

Aos meus amigos que fiz em Curitiba e todo o pessoal do laboratório LATOS que conviveram comigo durante todo este período. Onde passamos bons e maus momentos sem nunca perder a alegria.

Agradeço a todos que de uma maneira ou de outra contribuíram para que minha caminhada fosse possível. Obrigado.

RESUMO

Os solventes eutéticos profundos (DES) são uma alternativa potencial para a extração de compostos bioativos, devido à biodegradabilidade e biocompatibilidade com biocompostos de fontes naturais. Nesse contexto, as folhas de gravioleira emergem como uma fonte potencial de compostos bioativos, como antioxidantes, que podem trazer vários benefícios à saúde humana. De tal forma, é importante desenvolver processos que utilizem solventes não tóxicos para a extração, com baixa geração de resíduos e que não sejam prejudiciais aos biocompostos de interesse. No presente trabalho, o DES composto por cloreto de colina, como receptor de hidrogênio (RH), e açúcares ou álcoois, como doadores de hidrogênio (DH), foram submetidos a extração sólido-líquido dos compostos bioativos da folha de gravioleira, variando o tempo de 0,5 a 4h e a temperatura de 30, 45 e 60 °C, com razão líquido-sólido de 1:20. Os extratos obtidos foram analisados quanto a atividade antioxidante (DPPH e FRAP), fenólicos totais, flavonoides totais, avaliação antimicrobiana por difusão em ágar e o perfil fenólico por HPLC. Os resultados mostraram que os solventes ChCl:Xilitol e ChCl:Glicerol apresentaram maior atividade antioxidante (acima de 40 mg trolox / g amostra) a 45 °C e 2h de extração, e em comparação com os solventes convencionais apresentaram atividade antioxidante superior. No teste de difusão de ágar, verificou-se que apenas o ChCl: Xilitol apresentou efeito antimicrobiano intermediário de inibição no *Staphylococcus aureus*, de modo que o extrato inibiu próximo de 50% da atividade bacteriana em relação ao antibiótico. Além disso, foi realizada a análise do perfil fenólico por HPLC-DAD sendo possível a detecção de catequina e rutina no extrato, dois flavonoides de alta capacidade antioxidante. de tal forma, foi possível observar a alta capacidade de extração de compostos bioativos da folha de gravioleira utilizando o DES, além de maior atividade antioxidante em comparação com solventes convencionais. Desta forma, este trabalho demonstrou que os DES podem ser utilizados como um solvente promissor para a extração e conservação de compostos antioxidantes.

Palavras chave: Antioxidantes; Extração sólido-líquido; solventes eutéticos profundos.

ABSTRACT

Deep eutectic solvents (DES) are a potential alternative for extraction of bioactive compounds, due to the biodegradability and biocompatibility with biocompounds from natural sources. In this context, soursop leaves emerge as a potential source of bioactive compounds, such as antioxidants, which can bring several benefits to human health. In such a way, it is important to develop processes that use non-toxic solvents for the extraction, with low generation of residues and that are not harmful to the biocompounds of interest. In the present work, the DES composed of choline chloride, as a hydrogen bond acceptor (HBA), and sugars or alcohols, as hydrogen bond donors (HBD), were subjected to solid-liquid extraction of the bioactive compounds from the soursop leaf, varying the time from 0.5 to 4h and temperature at 30, 45 and 60 ° C, with a liquid-solid ratio of 1:20. The obtained extracts were analyzed for antioxidant activity (DPPH and FRAP), total phenolics, total flavonoids, antimicrobial evaluation by agar diffusion and the phenolic profile by HPLC. The results showed that the solvents ChCl: Xylitol and ChCl: Glycerol showed greater antioxidant activity (above 40 mg trolox / g sample) at 45 ° C and 2 hours of extraction, and compared to conventional solvents they presented superior antioxidant activity. In the agar diffusion test, it was found that only ChCl: Xylitol had an intermediate antimicrobial effect of inhibition in *Staphylococcus aureus*, so that the extract inhibited close to 50% of bacterial activity in relation to the antibiotic. In addition, the analysis of the phenolic profile by HPLC-DAD was carried out making it possible to detect catechin and rutin in the extract, two flavonoids with high antioxidant capacity. Then, was possible to observe the high extraction capacity of bioactive compounds from the soursop leaf employing DES, in addition to greater antioxidant activity in comparison with conventional solvents. Thus, this work demonstrated that DES can be used as a promising solvent for the extraction and conservation of antioxidant compounds.

Keywords: Antioxidant, Solid-liquid extraction, Deep eutectic solvents.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - GRAVIOLEIRA (<i>Annona muricata</i> L.).....	11
FIGURA 2 - FOLHA DE GRAVIOLEIRA	12
FIGURA 3 - DIAGRAMA DE FASES DE EQUILÍBRIO SÓLIDO-LÍQUIDO DE UMA SOLUÇÃO IDEAL E DE UM DES.	17
FIGURA 4 - REFERÊNCIAS PUBLICADAS ENTRE 2010 E 2019 SOBRE DES NA BASE SCOPUS.....	19
FIGURA 5 - PRINCIPAIS ÁREAS DE PUBLICAÇÃO SOBRE OS DES NA BASE SCOPUS.	19
FIGURA 6 - AÇÃO DAS ONDAS ULTRASONORAS NA MATRIZ.....	21
FIGURA 7 - FLUXOGRAMA ESQUEMÁTICO DO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.....	24
FIGURA 8 - FOLHA DA GRAVIOLEIRA EM PÓ.....	25
FIGURA 9 - EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓIS TOTAIS PRESENTES NA FOLHA DE GRAVIOLEIRA EMPREGANDO TECNOLOGIA ASSISTIDA POR ULTRASSOM E RAZÃO SÓLIDO-LÍQUIDO 1:20. RAZÃO MOLAR DOADOR-RECEPTOR: 2:1 PARA OS DES A BASE DE AÇÚCAR E 1:2 PARA OS DES A BASE DE ÁLCOOL. (A) T = 30 °C. (B) T = 45 °C. (C) T = 60 °C.	37
FIGURA 10 - EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FLAVONOIDES TOTAIS PRESENTES NA FOLHA DE GRAVIOLEIRA EMPREGANDO TECNOLOGIA ASSISTIDA POR ULTRASSOM E RAZÃO SÓLIDO-LÍQUIDO 1:20. RAZÃO MOLAR DOADOR-RECEPTOR: 2:1 PARA OS DES A BASE DE AÇÚCAR E 1:2 PARA OS DES A BASE DE ÁLCOOL. (A) T = 30 °C. (B) T = 45 °C. (C) T = 60 °C.	40
FIGURA 11 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PRESENTE NA FOLHA DE GRAVIOLEIRA EMPREGANDO TECNOLOGIA ASSISTIDA POR ULTRASSOM E RAZÃO SÓLIDO-LÍQUIDO 1:20. RAZÃO MOLAR DOADOR-RECEPTOR: 2:1	

	PARA OS DES A BASE DE AÇÚCAR E 1:2 PARA OS DES A BASE DE ÁLCOOL. (A) T = 30 °C. (B) T = 45 °C. (C) T = 60 °C.	42
FIGURA 12 - AVALIAÇÃO DA RAZÃO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES (DPPH/ FENÓIS TOTAIS) NA TEMPERATURA DE 45 °C UTILIZANDO DIFERENTES DES, COM RAZOES MOLARES DOADOR-RECEPRTOR DE 2:1 PARA OS DES A BASE AÇÚCAR 1:2 E PARA OS DES A BASE DE ÁLCOOL.....		44
FIGURA 13 - AVALIAÇÃO DA RAZÃO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES (FRAP/ FENÓLICOS TOTAIS) NA TEMPERATURA DE 45 °C UTILIZANDO DIFERENTES DES, COM RAZOES MOLARES DOADOR-RECEPRTOR DE 2:1 PARA OS DES A BASE AÇÚCAR 1:2 E PARA OS DES A BASE DE ÁLCOOL.....		45
FIGURA 14 - COMPARAÇÃO ENTRE AS MELHORES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO EMPREGANDO OS DES.....		46
FIGURA 15 - COMPARAÇÃO ENTRE A QUANTIDADE DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES EXTRAÍDOS APLICANDO SOLVENTES CONVENCIONAIS E OS DES, A 45°C E DUAS HORAS DE EXTRAÇÃO EMPREGANDO EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM.....		47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA FOLHA DE <i>Annona muricata</i> L.	11
TABELA 2 - BIOCÓMPOSTOS PRESENTES NA FOLHA DE GRAVIOLEIRA COM AÇÃO ANTIOXIDANTE.....	14
TABELA 3 - LISTA DE REAGENTES UTILIZADOS PARA A SÍNTESE DOS DES	29
TABELA 4 - RAZÃO MOLAR DOS DES SINTETIZADOS PARA A EXTRAÇÃO.....	30
TABELA 5 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PÓ DA FOLHA DE GRAVIOLEIRA.....	35
TABELA 6 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS DE MELHORES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO COM OS DADOS PRESENTES NA LITERATURA.....	46
TABELA 7 - VALORES OBTIDOS DE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS SELECIONADOS EMPREGANDO OS DES [CH]CL:GLI E [CH]CL:XIL POR HPLC-DAD.	48
TABELA 8 - VALORES OBTIDOS DE INIBIÇÃO DO EXTRATO E DO SOLVENTE UTILIZADO PROVENIENTE DO DES A BASE DE XILITOL EMPREGANDO TEMPERATURA DE 45°C E DUAS HORAS DE EXTRAÇÃO.....	50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	9
2.1. OBJETIVO GERAL	9
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3. REVISÃO DA LITERATURA	10
3.1. Gravioleira (<i>Annona muricata</i> L.)	10
3.2. ANTIOXIDANTES: FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES	13
3.3. POTENCIAL ANTIMICROBIANO	15
3.4. SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS (DES)	16
3.5. EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM	20
3.6. <i>Annona muricata</i> L.: ESTUDOS RELEVANTES	21
3.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE O ESTADO DA ARTE	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. OBTENÇÃO E PREPARO DA AMOSTRA	25
4.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA AMOSTRA	26
4.2.1. Umidade	26
4.2.2. Cinzas	26
4.2.3. Proteínas	26
4.2.4. Lipídeos	27
4.2.5. Fibras totais	27
4.3. SÍNTESE DOS DES	28
4.4. EXTRAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS DA FOLHA DE GRAVIOLEIRA (<i>Annona muricata</i> L) ASSISTIDO POR ULTRASSOM	30
4.5. AVALIAÇÃO DO EXTRATO	31
Determinação do teor de fenólicos totais por Folin-Ciocalteu	31
4.5.1. Determinação do teor de flavonoides totais	31
4.5.2. Determinação da atividade antioxidante por DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazila)	32
4.5.3. Determinação da atividade antioxidante por FRAP	32
4.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	33

4.7.	AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO (HPLC-DAD)	34
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
5.1.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PÓ DA FOLHA DE GRAVIOLEIRA	35
5.2.	EFEITO DOS DES E DOS PARÂMETROS DE OPERAÇÃO (TEMPO E TEMPERATURA) NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EMPREGANDO TECNOLOGIA ASSISTIDA POR ULTRASSOM	36
5.3.	EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FLAVONOIDES TOTAIS	39
5.4.	ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO METODOLOGIA DO DPPH	42
5.5.	AVALIAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO UTILIZANDO ULTRASSOM	43
5.6.	CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FENÓLICO (HPLC-DAD)	48
5.7.	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO EXTRATO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO	49
6.	CONCLUSÕES	52
6.1.	Produção científica	53
6.2.	Trabalhos apresentados em eventos	53
	REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

A gravioleira (*Annona muricata L.*) pertencente à família *Annonaceae* é amplamente produzida no Brasil, com maior predominância no estado da Bahia. Além do alto consumo mundial do fruto devido ao sabor e qualidade, há outras partes da planta que podem ser benéficas ao ser humano. Pode-se citar os caules, folhas e raízes, os quais são ricos em compostos bioativos e atualmente consumidos por meio de infusões. Dentre os principais compostos bioativos presentes, destacam-se os antioxidantes (McLAUGHLIN, 2008).

Os compostos antioxidantes possuem a função de sequestrador de radicais livres, além de possuírem também ação anticancerígena. Devido a sua função biológica os compostos antioxidantes estão cada vez mais ganhando espaço industrialmente. Para atender essa demanda, torna-se necessário processos de extração que utilizem solventes que não degradem os biocompostos de interesse, apresentem baixa toxicidade, facilitem a purificação do composto final, dentre outros. Com intuito de auxiliar na manutenção das propriedades dos biocompostos, diversos trabalhos têm avaliado uma nova classe de solventes verdes, denominados Solventes Eutéticos Profundos (DES, do inglês *Deep Eutectic Solvents*).

Os DES apresentam propriedades vantajosas do ponto de vista ambiental e econômico, tais como: baixo custo, baixa toxicidade, alta capacidade de solubilização e síntese simples. Os DES são produzidos por meio de dois ou mais componentes, de tal modo que, um deles atua como doador de hidrogênio (DH) e outro como receptor de hidrogênio (RH). Tradicionalmente utilizam-se sais quaternários de amônio como RH e como DH, compostos com: amidas, álcoois e ácidos carboxílicos e açúcares (DAI et al., 2013).

Além da escolha adequada do solvente é necessário também avaliar o método de extração e dentre os diversos métodos empregados destaca-se a extração assistida por ultrassom, que apresenta elevada eficiência, com um menor tempo e temperatura de processo.

O Laboratório de Termodinâmica e Operações de Separação (LATOS) tem se dedicado ao estudo do DES desde a obtenção de suas propriedades físico-químicas e

termodinâmicas e sua aplicação em processos de extração líquido-líquido e extração sólido-líquido para obtenção de biocompostos presentes em matrizes sólidas. Os resultados obtidos até o momento ressaltam a importância e potencial aplicabilidade desses solventes, além de suas vantagens em relação aos solventes convencionais.

Assim, o trabalho tem como objetivo a avaliação da extração sólido-líquido de biocompostos da folha de gravioleira (*Annona muricata* L.) empregando solventes verdes utilizando extração assistida por ultrassom.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Utilização de solventes eutéticos profundos para extração sólido-líquido de compostos bioativos presentes na folha de gravioleira (*Annona muricata* L.) empregando tecnologia assistida por ultrassom.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar e sintetizar DES de diferentes naturezas constituídos por cloreto de colina como receptor de hidrogênio e diferentes doadores de hidrogênio, tais como: álcoois e açúcares;
- Avaliar o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e capacidade antioxidante por meio das metodologias de DPPH e FRAP do extrato obtido da folha de gravioleira por meio da extração assistida por ultrassom em diferentes condições de tempo e temperatura;
- Avaliar as condições ótimas de extração (tempo e temperatura) por meio da relação entre compostos antioxidantes avaliados por DPPH e FRAP e compostos fenólicos totais;
- Avaliar os DES em relação aos solventes convencionais (água, etanol e etanol 50% (v/v));
- Avaliar o perfil fenólico dos extratos selecionados por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD);
- Avaliar o potencial antimicrobiano do extrato pela técnica de difusão em disco.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Gravioleira (*Annona muricata* L.)

A gravioleira (*Annona muricata* L.) é uma planta pertencente a família *Annonaceae*, a qual possui pelo menos 119 gêneros e mais de 2.000 espécies. Apesar da grande quantidade de espécies, apenas 13 possuem capacidade frutífera, e destas apenas 9 são comestíveis (MORAES, 2016).

Annona muricata L tem origem no continente americano, e assim foi distribuída através do mundo nas zonas tropicais. Para muitos países da África, Ásia e da América Central as derivadas da família *Annonaceae* são de extrema importância econômica. O maior consumo geralmente encontra-se no mercado interno dessas regiões e raramente ocorre a exportação dos frutos, apesar do seu grande potencial econômico. No caso da graviola os maiores produtores são: Brasil, México, Venezuela e Costa Rica. (SÃO JOSÉ, 2014).

No Brasil, a graviola foi introduzida por volta do século XVI pelos portugueses no estado da Bahia, onde instalou-se bem devido ao solo e características climáticas adequadas. Além da Bahia, os estados de Pernambuco, Alagoas, Ceará, Minas Gerais e São Paulo ocupam juntos a maior produção da fruta no território nacional (SACRAMENTO et al., 2009).

O estado da Bahia é o maior produtor mundial de graviola. O cultivo detém cerca de 85% em área de plantio da produção nacional contribuindo com 1,5 mil hectares plantados e com possibilidade de ampliação. Estima-se que a produção de graviola seja de 20 mil toneladas e com faturamento anual de R\$ 15 milhões ao ano (ADAB, 2015).

O cultivo da gravioleira tem sido impulsionado pela alta demanda de frutas tropicais no mercado consumidor e seus estudos diretamente ligados à indústria farmacêutica e de cosméticos para produção de diversos produtos, como por exemplo, os chás (SÃO JOSÉ et al., 2014).

A árvore da graviola apresenta porte ereto chegando a medir de 3,5 a 8,0 metros, como mostrado na FIGURA 1. Além disso possui alta densidade de ramos por área de copa. As folhas possuem características elípticas, duras, de pecíolos curtos e

apresentam coloração verde escura brilhante. Suas dimensões variam de 5 a 18 cm de comprimento e 2 a 7 cm de largura, quando adultas (MOSCA et al., 2006).

FIGURA 1 - GRAVIOLEIRA (*Annona muricata* L.)



FONTE: O Autor (2020).

As folhas de gravioleira, em sua composição centesimal, apresentam significativo teor proteico frente a outras espécies. Os valores aproximados obtidos por alguns autores sobre a composição físico química da folha de gravioleira, em base seca, são apresentados na TABELA 1.

TABELA 1 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA FOLHA DE *Annona muricata* L.

Composição (Base seca)	Umidade (%)	Proteínas (%)	Cinzas (%)	Lipídeos (%)
Folha seca em estufa (105°C)	8,7±0,1	15,6±0,3	6,8±0,3	11,5±0,1
	8,69±0,22	14,53±0,11	4,60±0,2	10,28±0,03

FONTE: Moraes, 2016; Elizabeth et al., 2018

Além do alto teor de proteínas, as folhas de gravioleira (FIGURA 2) apresentam diversos benefícios à saúde, tais como: relaxante do músculo estomacal, vasodilatadora, ação hipotensiva, antiespasmódica (McLAUGHLIN, 2008). No Peru, o uso das folhas de graviola está ligado ao combate de inflamações das membranas mucosas e as sementes do fruto são utilizadas para eliminar parasitas. Na Amazônia peruana as cascas, folhas e raízes são utilizados como chás (por meio de infusão em água quente), auxiliando na redução de diabetes e como sedativos (CARBAJAL et al., 1991; MATOS; LORENZI, 2008).

FIGURA 2 - FOLHA DE GRAVIOLEIRA



FONTE: O Autor (2020).

A folha de *Annona muricata* L apresenta diversos compostos bioativos, dentre eles destacam-se os compostos fenólicos, os quais possuem alto potencial antioxidante. Além disso, é composta por óleos essenciais (β -cariofileno, δ -cadineno e cadinol) e componentes químicos, tais como alcaloides e antioxidantes, sendo farmacologicamente ativos contra células tumorais (GONÇALVES, 2007).

Por ser um fruto de alta fonte nutricional, desde a década de 40 ocorrem estudos sobre a graviola, e como a folha torna-se uma parte subutilizada da planta e de baixo valor comercial em comparação ao fruto e rico em compostos bioativos seus estudos estão cada vez maiores. Entretanto, somente nos últimos anos os estudos têm-se intensificado devido a descoberta das acetogeninas anonáceas (ACGs), uma grande classe de compostos bioativos. A produção desses compostos ocorre de forma natural

pela folha, caule, casca e semente da gravioleira (MOGHADAMTOUSI et al., 2015). Diversos estudos comprovam a ação citotóxica significativa, possuindo toxicidade seletiva a diversas células cancerígenas (CHEN et al., 2012; HAMIZAH, et al., 2012).

As acetogeninas são policetídeos lipofílicos da família das Anonáceas de aspecto branco e ceroso, sendo caracterizadas por serem derivadas de ácidos graxos de cadeia longa e combinados com uma unidade de 2-propanol (McLAUGHLIN, 2008). Por meio de diversos estudos, é comprovada a elevada atividade antidiabética, antimalária, antiprotozoária, antibacteriana, pesticida, inseticida e anti-hiperlipidêmica (ALALI et al., 1999; BADRIE; SCHAUSS, 2009; FLORENCE et al., 2014).

3.2. ANTIOXIDANTES: FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES

Um dos problemas encontrados na indústria alimentícia está relacionado a oxidação dos produtos. A oxidação é provocada por diversos fatores, sendo o principal a presença de radicais livres, tais como radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$), radicais peroxila ($\text{ROO}\cdot$), radicais alcoxila ($\text{RO}\cdot$), ion superóxido (O_2), óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) e dióxido de nitrogênio ($\text{NOO}\cdot$) (HALLIWEL, 1997).

O aumento da quantidade de radicais livres tem como resultado a formação de compostos altamente reativos, tais como malonaldeído e hidroperóxidos lipídeos, resultando em interferências na bioquímica celular (VICENT; MORGAN; VICENT, 2004). Dentre os diversos componentes que sofrem alteração por ação dos radicais livres destacam-se os lipídeos, uma vez que a ação desses radicais causa a peroxidação lipídica. (URSO; CLARKSON, 2003).

No organismo humano, a grande quantidade de radicais livres gera desequilíbrio no sistema de defesa antioxidante, causando estresse oxidativo. Para evitar tal problema os antioxidantes atuam como sequestradores de radicais livres e seus precursores. Dentre as diversas substâncias com ação antioxidante destacam-se os compostos fenólicos, tais como flavonóides e tocoferóis (MACHEFER et al., 2004).

A ação antioxidante foi demonstrada por Frankel (1980), onde os antioxidantes (AH) atuam sobre os radicais hidroperóxidos ($\text{ROO}\cdot$) e sobre um radical geral ($\text{R}\cdot$) como mostrado nas EQUAÇÕES 1 e 2. Como resultado da inibição dos radicais livres por meio

dos antioxidantes, ocorre a formação do radical inerte ($A\bullet$) procedente do antioxidante, gerando estabilidade da reação. Toda a reação ocorre devido ao potencial de ressonância dos antioxidantes estabilizando o radical inerte ($ROOH$ e RH) e não formando o radical livre (MACHEFER et al., 2004).



Diversos estudos estão sendo realizados com finalidade de extrair altas quantidades de compostos antioxidantes de diversas matrizes alimentares e aplicação direta ou indireta em alimentos. Dentre os trabalhos destacam-se a extração de antioxidantes em limão (AL-QASSABI et al., 2018), amêndoas (DAMMAK et al., 2018), polpa de graviola (NETA et al., 2018).

A folha de gravioleira é rica em compostos antioxidantes, dentre os quais podem-se citar carotenóides, vitaminas, compostos ácidos dentre outros. Na TABELA 2 são ilustrados alguns compostos encontrados na folha de gravioleira com ação antioxidante, antimicrobiana e inseticida.

TABELA 2 - BIOCÓMPUESTOS PRESENTES NA FOLHA DE GRAVIOLEIRA COM AÇÃO ANTIOXIDANTE

Composto	Classificação
Catequina	Flavonóide
Ácido cafeico	Ácido hidroxicinâmico
Ácido gálico	Ácido hidroxibenzóico
Vitamina E	Tocoferol

FONTE: Coria-Télez et al. (2018).

Dentre as diversas propriedades da folha de gravioleira, destaca-se a ação antibacteriana, a qual é de grande interesse para aplicação em diversos alimentos. Para avaliação do potencial antimicrobiano são utilizados diversos testes, dentre eles, o teste antimicrobiano por halo de inibição.

3.3. POTENCIAL ANTIMICROBIANO

Existem diversos tipos de bactérias causadoras de problemas em alimentos e que são maléficos ao ser humano. Dentre elas podem-se citar *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.* Assim, é necessária a utilização de compostos para possível inibição desses microrganismos e com a finalidade de aumentar a vida de prateleira de diversos produtos alimentares (HAUBERT et al., 2019)

Os testes antimicrobianos avaliam atividade *in vitro* de diferentes agentes sobre os microrganismos escolhidos. Existem diversas análises possíveis para determinar a eficácia do composto, tais como o teste Elisa e o teste de β -lactamase. (JORGENSEN; FERRARO, 2009; ALONSO et al., 2017).

O teste por halo de inibição é qualitativo e amplamente utilizado na microbiologia prática e principalmente em isolados bacterianos devido sua alta confiabilidade e baixo custo. Nesse método, ocorre aplicação de diluições específicas de diferentes substâncias no disco de ágar, previamente inoculado com os microrganismos. Desse modo, caracteriza-se o isolado bacteriano como susceptível, intermediário ou resistente ao antimicrobiano testado (ALONSO et al., 2017).

Para a ação antimicrobiana, a planta ou extrato deve possuir alguns agentes, tais como compostos fenólicos e capacidade antioxidante. Os compostos fenólicos interagem com as proteínas da membrana bacteriana causando alterações nas funções, tais como, problemas na absorção de nutrientes, síntese de proteínas e transporte de elétrons. Os óleos essenciais possuem a mesma função devido à alta quantidade de compostos fenólicos (flavonoides e não flavonoides), álcoois alifáticos, aldeídos, cetonas, ácidos orgânicos, saponinas e tiosulfatos (PISOSCHI et al., 2018).

Diversas matrizes alimentares tem sido estudadas para identificar possível ação antimicrobiana. Dentre essas pode-se citar os subprodutos de vinícolas (SILVA et al., 2018), extrato de alecrim (LEE et al., 2018), óleos essenciais de diferentes frutos (KALIL et al., 2017) e butiá (HAUBERT et al., 2019). Em todos os casos analisados foi possível verificar diferentes níveis de inibição das bactérias.

A extração de diversos compostos bioativos, dentre eles os antibacterianos apresentam desafios no que se refere a sua extração e purificação, exigindo a utilização de novos solventes com alta capacidade de extração e estabilização dos compostos de interesse (CAO et al., 2018).

3.4. SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS (DES)

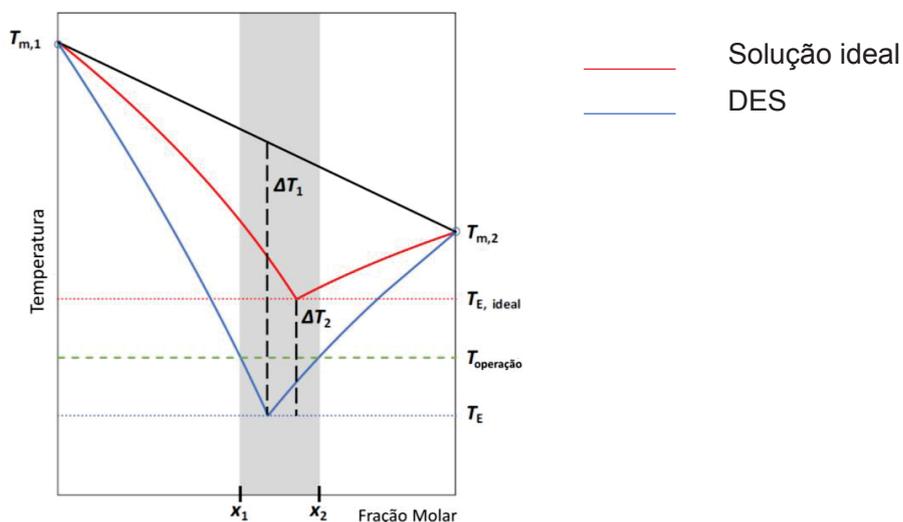
Em processos de extração de biomoléculas em geral, são utilizados solventes orgânicos e de baixo custo, tais como metanol, etanol e hexano, visando a máxima eficiência na extração. Entretanto, muitas vezes a toxicidade proveniente desses solventes é ignorada. (WANG et al., 2015).

Com base nesse contexto, surgiram os solventes verdes, os quais possuem por finalidade minimizar problemas causados na amostra, no operador do processo e por último, mas não menos importante, ao meio ambiente. (CUNHA; FERNANDES, 2018).

Abbott e colaboradores (2003) introduziram uma nova classe de solventes, os quais enquadram-se na classe de solventes verdes, denominados solventes eutéticos profundos (DES, *Deep Eutectic Solvents*). Esses novos solventes são obtidos por meio de dois ou mais compostos onde um deles possui a função de doador de hidrogênio (DH) e outro como receptor de hidrogênio (RH). Os mesmos autores sintetizaram o primeiro DES com utilização de cloreto de colina e ureia na proporção molar de 1:2, onde o cloreto de colina atuou como receptor de hidrogênio e a ureia como doador de hidrogênio.

Recentemente, Martins, Pinho e Coutinho (2018) concluíram que a principal característica de um DES é o grande abaixamento do ponto de fusão da mistura em relação ao ponto de fusão da solução ideal, obtendo assim denominação de solvente eutético profundo. A FIGURA 3 apresenta o comportamento de um equilíbrio sólido-líquido de solução ideal e de um DES.

FIGURA 3 - DIAGRAMA DE FASES DE EQUILÍBRIO SÓLIDO-LÍQUIDO DE UMA SOLUÇÃO IDEAL E DE UM DES.



FONTE: Martins, Pinho e Coutinho, 2018

Para a produção dos DES utilizam-se geralmente como receptores de hidrogênio os sais quaternários de amônio e com função de doadores de hidrogênio, compostos como: aminas, amidas, álcoois e ácidos carboxílicos, ou qualquer outro composto que possua tal função, formando uma mistura líquida a temperatura ambiente (MORAIS et al., 2015; RUESGAS-RAMÓN; FIGUEROA-ESPINOZA; DURAND, 2017; WANG et al., 2015; WANG et al., 2017).

As características e propriedades físicas dos DES são diretamente dependentes da natureza química e da proporção com que doador e receptor de hidrogênio são adicionados na mistura. De maneira geral, os DES apresentam densidade superior a da água e de seus componentes puros e alta viscosidade devido principalmente as ligações de hidrogênio, mas também em função das forças eletrostáticas que os formam. Estas características conferem aos DES baixa condutividade iônica e baixa tensão superficial, afetando o transporte de cargas (ABBOTT et al., 2004).

A alta viscosidade das misturas eutéticas é uma das maiores dificuldades na utilização desses solventes em processos de extração, por exemplo. No entanto, o aumento da temperatura e a adição de água promovem significativa diminuição da viscosidade dos DES. No entanto, a adição de água ao solvente eutético profundo gera

quebra parcial ou total das ligações de hidrogênio, alterando as propriedades do solvente (WANG et al., 2015).

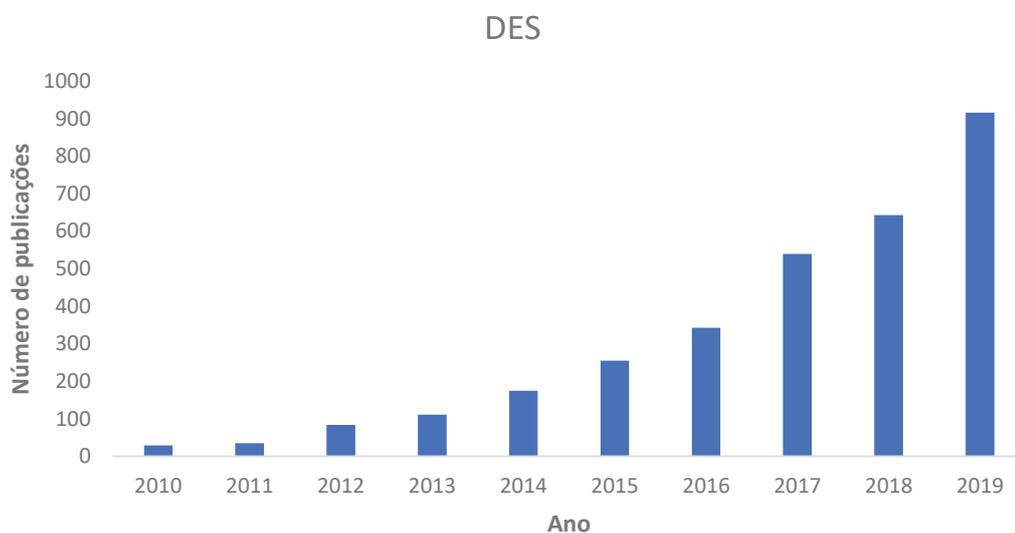
Os DES apresentam vantagens em relação aos solventes convencionais, como: baixo custo, fácil preparo, baixa ou nenhuma toxicidade, biodegradabilidade e fácil manuseio. Além disso é possível variar as formulações dos DES de forma a melhorar sua capacidade de extração, bem como ajusta-lá aos compostos de interesse, o que o caracteriza como *solvent design*. Ressalta-se que a característica de solvente verde, baixo custo e fácil obtenção está diretamente relacionada com os constituintes escolhidos para sua síntese (CHANDRAN et al., 2019).

As características conferidas aos DES os tornam de interesse para as mais diversas aplicações: extração sólido-líquido de biocompostos (BARBIERI, 2018; GOLTZ 2018), extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas (FARIAS et al., 2017; FARIAS et al., 2018), pré-tratamento da biomassa (CHEN; MU, 2019) e produção de biodiesel (MERZA et al., 2018).

De acordo com Cunha e Fernandes, (2018) há um valor próximo de 1300 referências sobre o DES, dos quais pouco mais de 300 enquadram-se na categoria de extração e estão ligadas diretamente as matrizes alimentares.

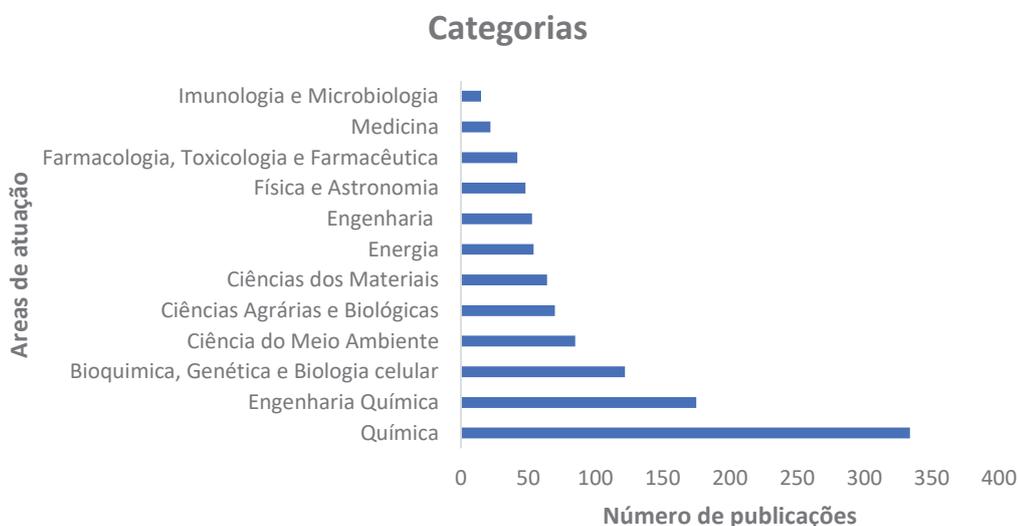
Nas FIGURAS 4 e 5 são expressas as publicações referentes a utilização dos DES relacionados a compostos fenólicos, e suas respectivas áreas de atuação realizadas entre 2010 a 2019, com base no *Scopus Database* (2020).

FIGURA 4 - REFERÊNCIAS PUBLICADAS ENTRE 2010 E 2019 SOBRE DES NA BASE SCOPUS.



FONTE: O Autor (2020).

FIGURA 5 - PRINCIPAIS ÁREAS DE PUBLICAÇÃO SOBRE OS DES NA BASE SCOPUS.



FONTE: O Autor (2020).

Com relação a utilização dos DES para extração de compostos oriundos de matrizes alimentares, há diversos estudos tais como: proteínas (JIANG et al., 2018), polissacarídeos (ZHANG; WANG, 2017, SANTOS et al., 2018), antioxidantes (AYDIN; YILMAZ; SOYLAK, 2018; CAO et al., 2018) e compostos fenólicos (BARBIERI, 2018; GOLTZ, 2018).

Além da escolha correta do solvente é necessário avaliar o processo de extração dos biocompostos. O processo de extração utilizando um solvente e uma amostra sólida é conhecido como extração sólido-líquido, o qual ocorre por meio da afinidade entre o solvente e os compostos de interesse da amostra, com intuito de máxima eficiência na transferência de massa do processo (TUŁEK et al., 2016).

Dentre os diversos métodos convencionais de extração sólido-líquido, podem ser citados também a extração por Soxhlet e a maceração, que apresentam vantagens como baixo custo e fácil operação de processo. No entanto, possuem diversas desvantagens, tais como longos períodos de extração, alta temperatura de processo e altas quantidades de solvente. Entre os métodos não convencionais de extração destaca-se a extração assistida por ultrassom, apresentando alto rendimento, em curtos períodos de tempo e apresentando baixo custo.

3.5. EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

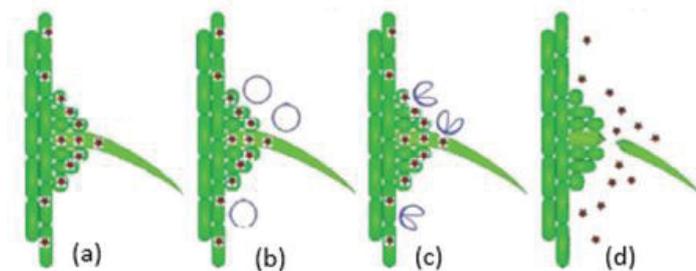
As ondas ultrassônicas estão cada vez mais sendo utilizadas para a extração de compostos bioativos devido as propriedades das ondas mecânicas, de frequências superiores a 20 KHz, e sua propagação em meios sólidos, líquidos e gasosos (CHEMAT et al., 2011, SANTOS, 2013).

As ondas ultrassônicas de alta potência produzidas pelo banho causam diversas mudanças químicas e físicas devido alteração de pressão que promovem nos líquidos, de tal modo a ocorrer o processo de cavitação. Com isso, ocorre a migração dos gases dissolvidos formando as microbolhas as quais aumentam e diminuem de tamanho até a implosão e liberação de calor juntamente com alta pressão próxima nessas regiões (VEILLET et al., 2010).

Com a ocorrência de colisões entre as microbolhas ocorre o rompimento das células vegetais, facilitando a difusão do solvente (agente extrator) no interior da matriz, aumentando a eficiência de extração deste método (FIGURA 6). O calor proveniente da implosão das microbolhas aumenta também a solubilidade devido ao aumento de temperatura. Como no processo de extração assistido por ultrassom ocorre agitação e a extração, aumenta-se também a eficiência do processo, necessitando de um menor tempo de extração, menor quantidade de solvente, além menores temperaturas,

diminuindo possíveis danos nos compostos de interesse (VILKHU et al., 2008, CARCEL et al., 2012).

FIGURA 6 - AÇÃO DAS ONDAS ULTRASONORAS NA MATRIZ.



FONTE: CHEMAT et al., 2017

A extração assistida por ultrassom é uma das tecnologias mais empregadas para o processo de extração na indústria de alimentos, uma vez que aumenta as taxas de transferência de massa nos processos alimentícios. Isso ocorre devido ao simples equipamento necessário e podendo ser adicionado co-solventes para ajustes da polaridade, quando necessário (VEILLET et al., 2010).

Os parâmetros que afetam o processo são distribuição da energia ultrassônica, temperatura, tamanho e disposição da amostra, intensidade das ondas de ultrassom, viscosidade e pressão de vapor do solvente (CASTRO et al., 2011, CÁRCEL et al., 2012).

A extração assistida por ultrassom é comumente utilizada para obtenção de biocompostos em alimentos, tais como alecrim (BARBIERI, 2019) e macela (GOLTZ, 2018).

3.6. *Annona muricata* L.: ESTUDOS RELEVANTES

Na literatura, diversos autores avaliaram os compostos antioxidantes presentes nos componentes da *Annona muricata* L. Coria-Téllez e colaboradores (2018) relataram a presença de diversos compostos fenólicos presentes na graviola e em sua polpa. Foram descritos um total de trinta e sete diferentes compostos, incluindo ácido gálico e quercetina além de flavonoides e tocoferóis, identificados em diferentes quantidades de acordo com os tipos de extração.

George e colaboradores (2014) em seu estudo sobre a folha de gravioleira identificaram uma melhor extração utilizando metanol em comparação com o extrato aquoso. O parâmetro de comparação dos solventes foi o teor de compostos fenólicos extraídos e consequente atividade antioxidante. Os valores encontrados para fenólicos totais variaram entre 0,7 a 36,2 μg ácido gálico equivalente/ μg amostra para o metanol, enquanto para o extrato aquoso obteve-se uma variação entre 0,6 a 19,1 μg ácido gálico equivalente/ μg amostra. Os resultados foram expressos em micrograma de ácido gálico equivalente por micrograma de amostra seca (μg ácido gálico equivalente/ μg amostra).

Moraes (2016), avaliou o teor de compostos fenólicos e consequente atividade antioxidante por meio da extração dos compostos bioativos presentes na folha de *Annona muricata* L. utilizando a extração assistida por ultrassom. A autora empregou como solventes etanol, metanol e água. A melhor condição de extração foi obtida utilizando etanol 50% e temperaturas de 50 °C ($100,3 \pm 2,8$ mg ácido gálico equivalente/ g amostra) e 70 °C ($93,2 \pm 2$ mg ácido gálico equivalente/ g amostra). Os resultados foram expressos em miligramas de ácido gálico equivalente por grama de amostra seca (mg ácido gálico equivalente/ g amostra).

Pinto et al. (2017), aplicaram o extrato da folha de gravioleira obtido pela extração por metanol em algumas bactérias, como *Bacillus cereus*, *Staphilococcus aureus*, *Escherichia coli* a fim de verificar a ação antimicrobiana do extrato. Foi possível concluir que as membranas das bactérias são a ação primaria dos compostos bioativos do extrato.

Mancini e colaboradores, 2018 utilizaram o extrato aquoso, rico em compostos fenólicos provando ser uma alternativa interessante para fornecimento de antioxidantes no cérebro e possível diminuição de problemas relacionados a depressão. Na análise de HPLC foi possível a detecção de diversos compostos flavonoides, fenólicos e alcaloides.

Justino et al., (2018) utilizando extrato etanoico das folhas de gravioleira empregaram-no em diversas análises antioxidantes (DPPH, FRAP, ORAC) e também verificaram ação antidiabética. Na análise de HPLC foram encontrados ácido clorogênico e cafeico, procianidinas, catequinas, quercetina e kaempferol. O extrato empregado juntamente com alguns polifenóis apresentou potencial antidiabético.

3.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE O ESTADO DA ARTE

Por meio da revisão bibliográfica foi possível verificar que a gravioleira (*Annona muricata* L.) é uma planta da família anonácea que possui como objeto de maior valor agregado o seu fruto, a graviola. No entanto, há outras partes da planta com grande potencial de compostos bioativos, tais como caule, galhos e folhas.

As folhas de gravioleira apresenta ser umas das partes mais subutilizada da planta e com menor valor agregado, no entanto quando verificada sua riqueza de compostos bioativos a torna uma matriz de enorme potencial. Os trabalhos da literatura avaliados até o momento realizaram o estudo das folhas para a extração de compostos bioativos utilizando solventes convencionais como água, etanol, metanol e suas frações. Desta forma, foi observado que os DES podem ser utilizados como solventes promissores na extração dos biocompostos presentes nesta matriz. Como os DES apresentam características de solventes verdes existe a possibilidade de uso dos biocompostos sem a etapa adicional de purificação. Além disso, espera-se que a utilização dos DES permita que a extração ocorra a temperaturas maiores do que as utilizadas com os solventes convencionais.

Dentre as operações de extração, a tecnologia assistida por ultrassom foi a escolhida devido a sua ação na matriz das plantas e, principalmente devido aos baixos tempos de extração necessários para apresentar rendimentos iguais ou superiores às técnicas convencionais aplicadas.

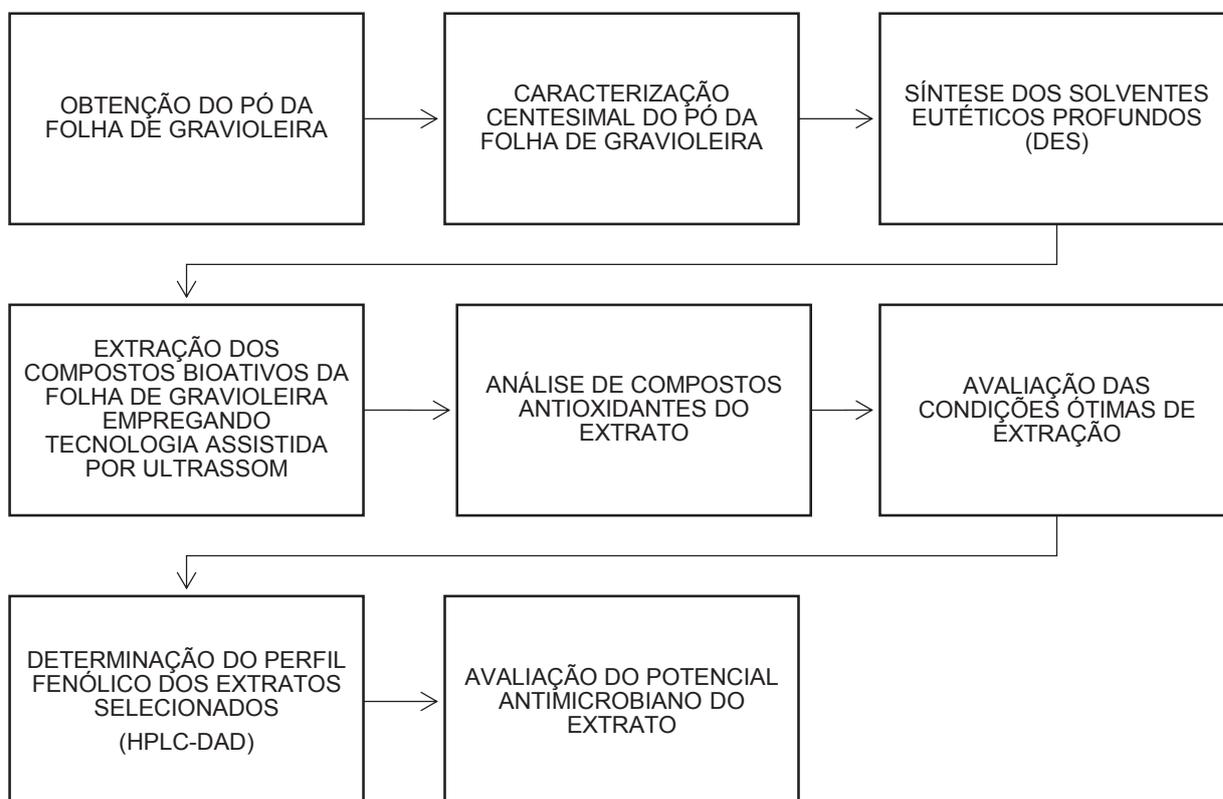
Desta forma, foi possível observar que todos os trabalhos analisados apresentaram a extração de compostos bioativos empregando solventes (metanol, água e etanol) e técnicas convencionais (maceração, soxhlet), podendo-se verificar a inovação do trabalho frente aos já realizados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios do PPGEAL (Programa de Pós graduação em Engenharia de Alimentos) sendo que boa parte dos dados foram obtidos no Laboratório de Termodinâmica e Operações de Separação (LATOS), da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba-PR.

A FIGURA 7 apresenta um fluxograma esquemático do desenvolvimento no decorrer trabalho.

FIGURA 7 - FLUXOGRAMA ESQUEMÁTICO DO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.



FONTE: O Autor (2020).

4.1. OBTENÇÃO E PREPARO DA AMOSTRA

As folhas de gravioleira (*Annona muricata* L) foram coletadas no IAPAR (S 25° 510'381'', W 48° 810'278'') localizado no município de Morretes, estado do Paraná-BR, cadastrado no SISGEM (AA5E976), exisicata (MBM185777). Após a lavagem e retirada dos galhos, as folhas foram submetidas a secagem em secador com circulação de ar forçado da marca FABBE, com temperatura de 45 °C, por um período de 24 horas. Após a secagem, as folhas foram trituradas em um moinho de facas e o pó selecionado de acordo com sua granulometria (20 mesh).

Em seguida o pó (FIGURA 8) foi embalado a vácuo e acondicionado ao abrigo da luz.

FIGURA 8 - FOLHA DA GRAVIOLEIRA EM PÓ.



FONTE: O Autor (2020).

4.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA AMOSTRA

4.2.1. Umidade

A determinação da umidade da amostra foi realizada segundo metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008). O conjunto cadinho e amostra foi colocado em estufa (SE RETILINEA modelo 315/2) com circulação de ar a 105 °C por 24 horas. Em seguida, o cadinho foi resfriado em dessecador e pesado para obtenção da massa da matéria seca restante, indicando assim a quantidade de umidade perdida pela amostra. A análise foi feita em triplicata

4.2.2. Cinzas

Para determinação de cinzas foram pesados 3 g da amostra em cadinho. Em seguida o conjunto foi colocado na mufla a temperatura de 550 °C até a formação de cinzas de coloração branca ou ligeiramente acinzentada. O cadinho foi retirado da mufla, colocado em dessecador até atingir a temperatura ambiente e pesado. (ADOLFO LUTZ, 2008).

4.2.3. Proteínas

Para análise de proteínas será realizada a determinação de nitrogênio pelo processo de digestão de Kjeldahl, segundo metodologia proposta pela AOAC (2005). Foi pesado aproximadamente 0,5 g de amostra, a qual foi submetida à digestão com ácido sulfúrico, formando sulfato amoniacal. A destilação foi realizada por arraste de vapor de amônia, em seguida redirecionada para um erlenmeyer contendo ácido bórico a 4%, tornando a solução de coloração verde. Por último, a amônia foi titulada com ácido sulfúrico 0,02 M até a primeira coloração cor-de-rosa. Assim, foi possível obter a porcentagem de proteína através da EQUAÇÃO 3, onde V é o volume de ácido sulfúrico gasto na titulação (mL), P é o peso da amostra (g) e fc é o fator de correção do ácido sulfúrico e Fc fator de conversão empregado para plantas, sendo utilizado o valor de 5,7.

$$\%proteinas = \frac{V \times 0,00028 \times fc \times Fc \times 100}{P} \quad (3)$$

4.2.4. Lipídeos

Para determinação de lipídeos foi feita a extração da amostra a quente com éter de petróleo (AOAC, 2005). Inicialmente 5 g de amostra foram pesadas em papel filtro e levados ao extrator de soxhlet, acoplado em um condensador de bolas e balão de fundo chato previamente padronizado. O extrator foi ser mantido em aquecimento por aproximadamente 6 horas. O solvente destilado e o balão com o resíduo etéreo foram levados à estufa para secagem e posterior pesagem. O teor de extrato etéreo foi expresso em porcentagem, segundo a diferença de peso do balão padronizado e o balão com o extrato etéreo.

4.2.5. Fibras totais

Para determinação das fibras utilizou-se o kit enzimático Megazyme (Megazyme International, Wicklow, Irlanda) (AOAC, 2002). Realizou-se a análise em quadruplicata, pesando-se 1 g de amostra em béquer Berzelius. Para a hidrólise da amostra, adicionou-se aproximadamente 40 mL de solução tampão MÊS-TRIS (0,08 mol L⁻¹, pH 8.2), e 50 µL de α-amilase termoestável (Megazyme®) e levou-se ao aquecimento a 95 °C durante 30 minutos, com agitação esporádica. Resfriou-se até 60 °C e adicionou-se 10 mL de água destilada para remover resíduos da parede do béquer. Em seguida, adicionou-se 100 µL da protease (Megazyme®), cobriu-se novamente os béqueres com folha de alumínio e levou-se ao banho de aquecimento a 60 °C com agitação contínua por 30 minutos, resfriou-se e corrigiu-se o pH para 4.

Na sequência adicionou-se 200 µL de amiloglucosidase (Megazyme®), cobriu-se novamente os béqueres com folha de alumínio e levou-se ao banho de aquecimento a 60 °C por 30 minutos sob agitação. Preparou-se cadinhos com Celite 545 (Reatec) e calcinou-se o cadinho a 525 °C por 1h na mufla, resfriou-se em dessecador, pesou-se 0,5 g de celite no cadinho, em seguida secou-se em estufa a 105 °C e resfriou-se em dessecador. Tarou-se o cadinho com celite e distribuiu-se a celite no cadinho com aproximadamente 3 mL de água destilada. Aplicou-se o vácuo utilizando uma bomba de

vácuo. Para determinação da fibra insolúvel, filtrou-se a vácuo a mistura hidrolisada anteriormente e lavou-se o resíduo 2 vezes com 10 mL de água destilada a 70 °C, alternativamente entre estas etapas realizou-se a centrifugação. O filtrado foi guardado para determinação de fibra solúvel em béquer de 600 mL.

Na sequência secou-se o cadinho a 105 °C, resfriou-se em dessecador e pesou-se. Uma das replicatas foi utilizada para determinação de proteínas (Kjeldahl, fator 6,25) e outra para cinzas (5 h a 525 °C). Para quantificar a fibra solúvel pesou-se o filtrado da etapa anterior e adicionou-se 4 vezes o volume inicial da amostra de Etanol 95% aquecido a 60 °C, para promover a precipitação. Usou-se uma porção de Etanol para enxaguar o filtro. Alternativamente, ajustou-se o volume do filtrado para 80 mL e adicionou-se 320 mL de Etanol 95% a 60 °C. Tarou-se o cadinho com celite, distribuiu-se a celite no cadinho com aproximadamente 3 mL de água destilada. Aplicou-se o vácuo. Filtrou-se o precipitado da anterior. Utilizou-se Etanol 78% para transferir quantitativamente as partículas do precipitado para o cadinho. Lavou-se o resíduo, sob vácuo, com duas porções de 15 mL de Etanol 78%, Etanol 95%, e acetona. Na sequência secou-se o cadinho a 105 °C e resfriou-se em dessecador e pesou-se. Em seguida, determinou-se proteína e cinzas, sendo uma das replicatas usada para determinação de proteína (Kjeldahl fator 5,7) e outra para cinzas (5 h a 525 °C).

4.3. SÍNTESE DOS DES

Os DES utilizados para extração foram sintetizados a partir do método de aquecimento, conforme Dai e colaboradores (2013). Os reagentes foram pesados em balança analítica Metler Toledo AL204, com proporções pré-definidas a partir de informações da literatura, experiência do grupo de pesquisa e ensaios preliminares. Em seguida a mistura foi disposta em banho-maria com agitação orbital tipo Dubnoff, com valor fixado de 220 rpm juntamente com temperatura pré-definida e estabilizada.

A temperatura de síntese depende das características dos doadores de hidrogênios utilizados, sendo que para os sólidos, tais como os açúcares, utiliza-se 70 °C e para os líquidos, tais como os álcoois, 60 °C. A mistura foi mantida em banho-maria com agitação até a formação de um líquido transparente e homogêneo sendo que o

tempo pode variar entre algumas horas até 24 horas. Após formação completa, os frascos já devidamente fechados, foram colocados em dessecador fora do contato com a luz.

Foi utilizado o cloreto de colina como receptor de hidrogênio (RH) e diferentes compostos como doadores de hidrogênio (DH) como açúcares e álcoois em diferentes razões molares. A TABELA 3 apresenta os reagentes empregados para a síntese dos DES.

TABELA 3 - LISTA DE REAGENTES UTILIZADOS PARA A SÍNTESE DOS DES

Reagente	Marca	Pureza	$\log K_{(ow)}$ doadores de hidrogênio
Cloreto de colina	Merck	$\geq 0,9900$	-
1,2 Propanodiol	Merck	$\geq 0,9900$	-0,748
Etilenoglicol	Neon	$\geq 0,9995$	-1,36
Glicerol	Alphatec	$\geq 0,9950$	-1,88
Sorbitol	Panreac	$\geq 0,9900$	-2,20
Xilose	Exôdo	$\geq 0,9900$	-2,65
Xilitol	Dinâmica	$\geq 0,9900$	-3,22

FONTE: O Autor (2020).

A TABELA 4 apresenta as razões molares entre DH e RH estabelecidas para o trabalho.

TABELA 4 - RAZÃO MOLAR DOS DES SINTETIZADOS PARA A EXTRAÇÃO.

Receptor de hidrogênio	Doador de hidrogênio	Razão molar	Abreviação
Cloreto de colina	1,2-propanodiol	1:2	[Ch]Cl : Prop
Cloreto de colina	Etilenoglicol	1:2	[Ch]Cl : Etg
Cloreto de colina	Glicerol	1:2	[Ch]Cl : Gli
Cloreto de colina	Sorbitol	2:1	[Ch]Cl : Sorb
Cloreto de colina	Xilose	2:1	[Ch]Cl : Xilo
Cloreto de colina	Xilitol	2:1	[Ch]Cl : Xil

FONTE: O Autor (2020).

4.4. EXTRAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS DA FOLHA DE GRAVIOLEIRA (*Annona muricata* L) ASSISTIDO POR ULTRASSOM

Inicialmente foram adicionados o DES em frasco âmbar e em seguida adicionado o pó de folha de gravioleira. O sistema foi colocado em banho de ultrassom FISHER SCIENTIFIC- FS30D, de frequência 40 kHz com controle de temperatura. Foram avaliadas as temperaturas de 30, 45 e 60 °C. O tempo de extração utilizado foi de 0,5 horas a 4 horas de extração, com intervalos de 0,5 horas. A razão soluto-solvente foi mantida na razão de 1:20 (BARBIERI, 2018; GOLTZ, 2018; BARBIERI et al., 2020).

Ao final da extração as amostras foram filtradas e submetidas a análise de fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante.

Para fins de comparação foi realizada a extração utilizando os solventes água, etanol e fração etanol:água (50% v/v), sendo estes escolhidos devidos sua menor toxicidade. As extrações foram feitas na temperatura e tempo que forneceram os melhores resultados para os DES.

4.5. AVALIAÇÃO DO EXTRATO

Determinação do teor de fenólicos totais por Folin-Ciocalteu

A metodologia para determinação de compostos fenólicos totais utilizada foi a de Singleton e Rossi, 1965 e alterada por Bakirtzi et al., 2016. Inicialmente foi adicionado 1,68 mL de água em tubo de *eppendorfs*, na sequência, adiciona-se 20 µL do extrato diluído em água (1:10 v/v) e 100 µL do reagente Folin-Ciocalteu. Em seguida os *eppendorfs* foram mantidos em repouso sem contato com a luz por aproximadamente 3 minutos. Por fim, é adicionou-se uma solução de Na₂CO₃ 20% (m/v) para que a reação seja interrompida e as amostras então foram mantidas por 60 minutos ao abrigo da luz para realização da leitura da absorbância das amostras em um comprimento de onda de 760 nm.

Foi construída uma curva padrão utilizando o ácido gálico alterando as concentrações de 0,1 a 0,8 mg/mL. Os resultados obtidos foram expressos em mg de ácido gálico por grama de amostra (mg ácido gálico equivalente/ g amostra). Os gráficos foram expressos em mg AGE/ g amostra.

4.5.1. Determinação do teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado por meio do método colorimétrico utilizando cloreto de alumínio. Misturou-se 250 µL de extrato previamente diluído com 750 µL de etanol (99,8 % m/m), 50 µL de cloreto de alumínio (10 % m/v), 50 µL de acetato de potássio (1 mol/l) e 1,4 mL de água destilada. As amostras serão devidamente misturadas e encubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Em seguida a absorbância das amostras foi medida utilizando um espectrofotômetro UV-Vis a 415 nm, o teor de flavonoides será expresso em miligramas de quercetina por grama de amostra (mg quercetina/ g amostra), utilizando uma curva padrão. A amostra do branco corresponde a solução de cloreto de alumínio (10 % v/v) e acetato de potássio (1 mol/L) onde o extrato será substituído por um mesmo volume de água destilada (PROMMUAK; DE-EKNAMKUL e SHOTIPRUK, 2008).

4.5.2. Determinação da atividade antioxidante por DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazila)

A determinação de capacidade antioxidante por DPPH consiste na utilização do reagente 2,2 difenil-1-picril-hidracila. A reação ocorre por meio da ligação do radical DPPH com um antioxidante, fazendo assim que a solução antes de coloração violeta escuro, torne-se violeta claro (BRAND WILLIANS et al., 1995).

A metodologia consiste na construção de uma curva padrão utilizando metanol, empregando um padrão Trolox variando as concentrações de 0,2 a 0,9 mmol/mL. Em seguida transferiu-se uma alíquota de 50 µL do extrato diluído (1:10 v/v) em água e transferida para *eppendorfs* já preparados com 1,95 mL de DPPH 0,0395 mg/mL. Em seguida os sistemas foram agitados por vórtex. Após 30 minutos em repouso foi realizada a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro (Shimadzu® 1800) utilizando comprimento de onda de 517 nm. A porcentagem de inibição do DPPH foi avaliada de acordo com uma curva padrão Trolox. Os resultados foram expressos em mg trolox/ g amostra.

4.5.3. Determinação da atividade antioxidante por FRAP

A análise de atividade antioxidante por FRAP foi utilizada para determinação das melhores condições de extração. Essa metodologia consiste na redução de ferro (Fe III), percebida visualmente pela geração de uma solução de cor azul clara, para Fe II, de solução de coloração azul escura por ação do TPTZ (2,4,6- tri (2-piridil) -1,3,5 triazina). Preparou-se a solução de FRAP a partir de uma solução tampão de acetato de sódio a 300 mmol/L de pH= 3,6, cloreto férrico hexahidratado a 20 mmol/L e TPTZ 10 mmol/L, a qual diluiu-se com ácido clorídrico a 40 mmol/L. Foi adicionado em *eppendorfs* 1,35 mL do reagente FRAP juntamente com 45 µL da amostra ou padrão (trolox) e 135 µL de água deionizada. Após a agitação aguardou-se 30 minutos de reação em ausência de luz. A leitura da absorbância da amostra foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu® 1800) empregando comprimento de onda de 595 nm, tendo resultado comparado com a curva padrão. Os resultados foram expressos em mg sulfato férrico/g amostra.

As análises de DPPH e FRAP foram utilizadas com intuito de avaliação da capacidade antioxidante do extrato.

Para todas as análises realizadas (Folin-ciocalteu, flavonoides totais, DPPH e FRAP) foram feitos brancos com os solventes empregados para extração.

4.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana foi determinada segundo Bauer et al. (1966). As bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Clostridium perfringens* (ATCC 13124), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Salmonella spp* (ATCC 13076) foram utilizadas com finalidade de avaliar a inibição do extrato obtido.

Primeiramente, realizou-se a reativação das bactérias selecionadas em caldo Muller Hinton a 37 °C por 24 h. Após essa etapa foram repicadas em ágar Muller Hinton 37 °C por 24 h.

Sequencialmente, coletaram-se os inóculos com o auxílio de alça de repicagem do ágar Muller Hinton e foram transferidos para solução salina (0,9 %) até atingir concentração de 10⁸ UFC/mL (equivalente à solução padrão de McFarland de 0,5 ou 80 % de transmitância) (BAUER et al., 1966).

O ágar Muller Hinton (25 mL) foi adicionado em placas de Petri, inoculadas em superfície utilizando swab estéril com 0,1 mL dos microrganismos (10⁸ UFC/mL). Na superfície do ágar foram adicionados os discos de 2 mm de diâmetro com os respectivos extratos obtidos, sem diluição (20 µL). Por último as placas foram invertidas e incubadas a 37 °C por 24 horas.

Para o controle positivo utilizou-se o cloranfenicol e para controle negativo será utilizado os DES.

Os resultados foram analisados de acordo com o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (*The Clinical and Laboratory Standards Institute*). A ação antimicrobiana foi classificada em susceptível (S, halos de inibição maiores de 18 mm), intermediário (I, halos de inibição entre 13 a 17 mm) e resistentes (R, valores menores que 12 mm de halo de inibição) (CLSI, 2016).

4.7. AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO (HPLC-DAD)

O método cromatográfico utilizado foi adaptado de Belmiro e colaboradores (2017). Para tanto, utilizou-se a coluna ACE 5 C-18.

Como fase móvel foi utilizado solução aquosa 0,1% em ácido fórmico (v/v) (Solução A) e acetonitrila (Solvente B). O gradiente utilizado foi de 0 a 15 minutos de 8% para 30% de B (7 minutos), de 22 a 25 minutos para 70% de B (10 minutos) e de 35 a 40 minutos para 8% de B. O tempo total de corrida de 40 minutos com fluxo de fase móvel de 1,2 mL/min. O volume de injeção foi de 100µL de amostra.

A temperatura empregada na coluna no processo foi de 35 °C e temperatura no carrossel da amostra de 30 °C.

Detecção foi feita por DAD (*Detector diode array*) com varredura de 200 a 400 nm, com monitoramento nos comprimentos de onda de 270 (rutina), 280 (catequina, epicatequina), 330 (ácidos clorogênicos) e 360 (quercetina) nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos da folha de gravioleira, tais como: caracterização físico-química, extração de compostos fenólicos totais e flavonoides. Será também apresentado a atividade antioxidante, avaliação das melhores condições de extração, avaliação do perfil fenólico e aplicação do teste antimicrobiano.

5.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PÓ DA FOLHA DE GRAVIOLEIRA

A caracterização físico-química do pó da folha de gravioleira em termos dos teores de umidade em base seca, proteínas totais, cinzas e lipídeos estão apresentados na TABELA 5.

Ao comparar os dados obtidos neste trabalho com os da literatura observa-se valores similares entre as amostras, as variações encontradas podem estar relacionadas com a estação do ano, local de colheita e tipo de solo (MORAES, 2016).

TABELA 5 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PÓ DA FOLHA DE GRAVIOLEIRA.

	Presente estudo	Elizabeth et al (2018)	Moraes, (2016)
Umidade (%)	8,40 ± 0,20	8,69 ± 0,22	8,70 ± 0,10
Proteínas (%)	11,24 ± 0,11	14,53 ± 0,11	15,60 ± 0,30
Cinzas (%)	6,00 ± 0,03	4,60 ± 0,20	6,80 ± 0,30
Lipídeos (%)	7,41 ± 0,57	10,28 ± 0,03	11,5 ± 0,10
Fibras totais (%)	45,93 ± 0,28	52,63 ± 0,36	-

FONTE: O Autor (2020).

O teor de umidade para armazenamento deve ser inferior a 15%, devido ao possível crescimento microbiano (BRASIL, 2005). A folha de gravioleira em pó atingiu teor de umidade inferior ao da legislação, garantindo o não crescimento microbiano. A

folha de gravioleira apresenta elevado teor de proteína, entretanto a sua biodisponibilidade é reduzida devido ao alto teor de fibras presente na folha.

Além disso, a folha apresenta alto teor de fibras totais, o que auxilia na redução do colesterol, melhora nos índices de glicemia, redução de peso corporal e na melhora do sistema imunológico (YANG et al., 2020).

5.2. EFEITO DOS DES E DOS PARÂMETROS DE OPERAÇÃO (TEMPO E TEMPERATURA) NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EMPREGANDO TECNOLOGIA ASSISTIDA POR ULTRASSOM

O efeito dos diferentes DES e dos parâmetros de operação (tempo e temperatura) no processo de extração dos compostos fenólicos totais são apresentadas na FIGURA 9.

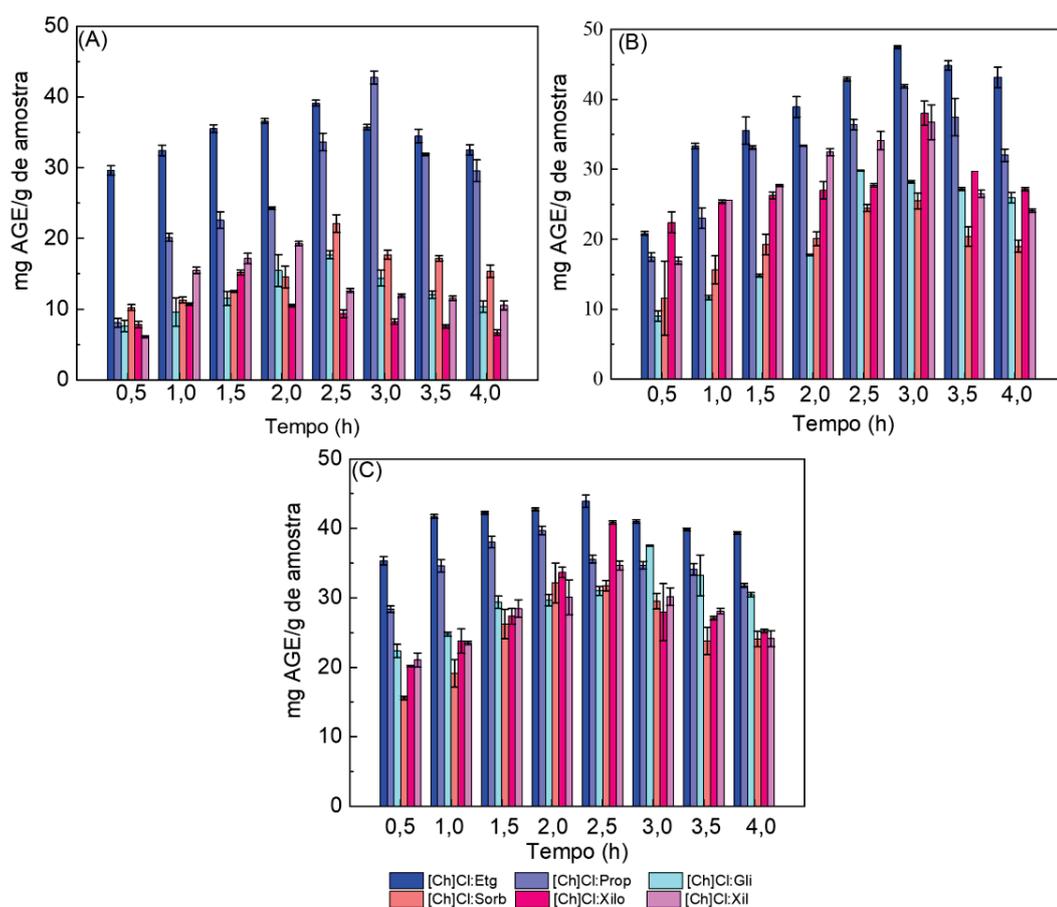
Foram avaliados seis DES diferentes sintetizados com álcoois: etilenoglicol, 1,2-propanodiol e glicerol e açúcares: sorbitol, xilose e xilitol como doadores de hidrogênio (DH) e cloreto de colina ([Ch]Cl) como receptor de hidrogênio. A razão molar soluto solvente foi de 1:20, mantida constante nas temperaturas de 30, 45 e 60 °C.

Os DES e a razão molar doador utilizados foram selecionados em função da sua boa aplicabilidade para extração de compostos bioativos presentes em outras matrizes como produtos naturais, toranja, subprodutos da empresa alimentícia, caroço de azeitona, trigo sarraceno, casca de laranja, cavalinha do pântano (DUAN et al., 2016; EL KANTAR et al., 2019; FERNÁNDEZ et al., 2018; GARCÍA et al., 2016 ; JIANG et al., 2019; MANSUR et al., 2019; OZTURK et al., 2018; QI et al., 2015).

A polaridade do solvente variou de acordo com o doador de hidrogênio utilizado, uma vez que o receptor de hidrogênio foi o mesmo para todos os DES utilizados neste trabalho. Comparando os valores de $\log K_{(ow)}$ (TABELA 3) observa-se que os DES obtidos com açúcares apresentam polaridade maior, em comparação aqueles obtidos utilizando álcoois de cadeia curta como o glicerol, e 1,2-propanodiol, pois quanto maior o valor de $\log K_{(ow)}$ para o DH, maior a hidrofobicidade apresentada. Foi possível observar que os DES a base de álcool, utilizando doadores de hidrogênio como o etilenoglicol e o 1,2-propanodiol, apresentaram os maiores rendimentos de extração dos fenóis totais (acima de 20 mg ácido gálico equivalente/ g amostra) independente das condições de extração

empregadas, devido a maior afinidade com os compostos fenólicos quantificados em relação aos DES a base de açúcar.

FIGURA 9 - EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓIS TOTAIS PRESENTES NA FOLHA DE GRAVIOLEIRA EMPREGANDO TECNOLOGIA ASSISTIDA POR ULTRASSOM E RAZÃO SÓLIDO-LÍQUIDO 1:20. RAZÃO MOLAR DOADOR-RECEPTOR: 2:1 PARA OS DES A BASE DE AÇÚCAR E 1:2 PARA OS DES A BASE DE ÁLCOOL. (A) T = 30 °C. (B) T = 45 °C. (C) T = 60 °C.



FONTE: O Autor (2020).

Observa-se que quando utilizados DH de açúcares ocorre a formação de solventes que apresentam maior viscosidade (cerca de 400 mPa.s à 30 °C) frente aos solventes sintetizados empregando álcoois (cerca de 250 mPa.s à 30 °C). Essa diferença de viscosidade está relacionada à formação de uma extensa rede de ligação de hidrogênio entre os componentes utilizados para a síntese do solvente (FERNÁNDEZ et al., 2018; YADAV; RAI; PANDEI, 2014). Solventes com maior viscosidade afetam o processo de extração dificultando a interação entre os biocompostos de interesse e o

solvente propriamente empregado, conseqüentemente diminuindo o rendimento de extração (FERNÁNDEZ, et al., 2018). Durante a realização dos experimentos foi possível observar que os DES a base de açúcar apresentaram viscosidade extremamente superior quando comparados aos DES a base de álcoois.

O aumento da temperatura promove a diminuição das interações de hidrogênio, ocasionando a redução da viscosidade e facilitando a dissolução das moléculas nos solventes (MANSUR et al., 2019; RUESGAS-RAMÓN et al., 2017). Esse efeito pode ser verificado principalmente nos DES a base de açúcares (ALOMAR et al., 2016; YADAV et al., 2014). No caso do DES de ChCl:Glicerol, a 30 °C o solvente apresentava uma viscosidade de 246,79 mPa.s, a 45 °C, 107,47 mPa.s e a 60 °C 53,81 mPa.s (YADAV; RAI; PANDEI, 2014).

Os resultados obtidos (FIGURA 9) indicam que o aumento da temperatura favoreceu a extração de compostos fenólicos totais para todos os DES empregados. Para os DES a base de álcool os valores obtidos foram de 36 a 40 mg ácido gálico equivalente/ grama de amostra para 30 °C, entre 40 e 44 mg ácido gálico equivalente/ g amostra a 45 °C e variando entre 42 a 46 mg de ácido gálico equivalente/ grama de amostra para 60 °C. Para os DES a base de açúcar, os resultados obtidos foram de 8 a 23 mg ácido gálico equivalente/ g amostra para a temperatura de 30 °C, 12 a 40 mg ácido gálico equivalente/ g amostra e por último, para 60 °C valores de extração entre 20 a 42 mg ácido gálico equivalente/ g amostra. O aumento na extração de compostos fenólicos totais foi mais significativo, devido a redução da viscosidade deste solvente ser mais pronunciada em relação ao DES a base de álcool. O aumento da temperatura de 45 para 60 °C apresentou aumento na extração de compostos fenólicos totais extraídos, no entanto esse aumento torna-se menos notável frente ao aumento de temperatura de 30 para 45 °C.

Observa-se comportamento semelhante por outros autores em relação ao aumento na extração de compostos fenólicos totais de diferentes matrizes empregando DES com o aumento da temperatura. Chanioti e Tzia (2018) empregaram como matriz o bagaço de azeitona e obtiveram aumento significativo da extração com o aumento da temperatura de 45 °C para 60 °C. Xie e colaboradores (2019) empregaram como matriz o rizoma de *Ligusticum chuanxiong Hort* e obtiveram as melhores condições de extração

a 68 °C. Zhou e colaboradores (2018) utilizaram como matriz folhas de noz e obtiveram a temperatura de 40 °C como parâmetro para as melhores condições de extração.

Além dos parâmetros citados, neste trabalho também foram avaliados diferentes tempos no processo de extração, pois este parâmetro varia de acordo com a matriz, o qual pode variar desde trinta minutos até quatro horas ou mais de extração (ALI et al., 2019; CAI et al., 2019; CHANIOTI e TZIA, 2018; VIEIRA et al., 2018; XIE et al., 2019). Caso o tempo de extração seja muito alto é possível ocorrer uma degradação oxidativa dos compostos alvo, além de tornar-se um processo inviável economicamente (LIU et al., 2019).

Os resultados obtidos indicaram que os DES a base de álcool extraíram o maior teor de compostos fenólicos totais no período entre uma a duas horas e meia de extração, apresentando valores acima de 45 mg ácido gálico equivalente/ g amostra. Pode-se observar que acima do tempo relatado, em geral os DES a base de álcool apresentaram redução no teor extraído de compostos fenólicos totais, devido ao estresse térmico ocasionado pelas ondas ultrassônicas e a temperatura de processo.

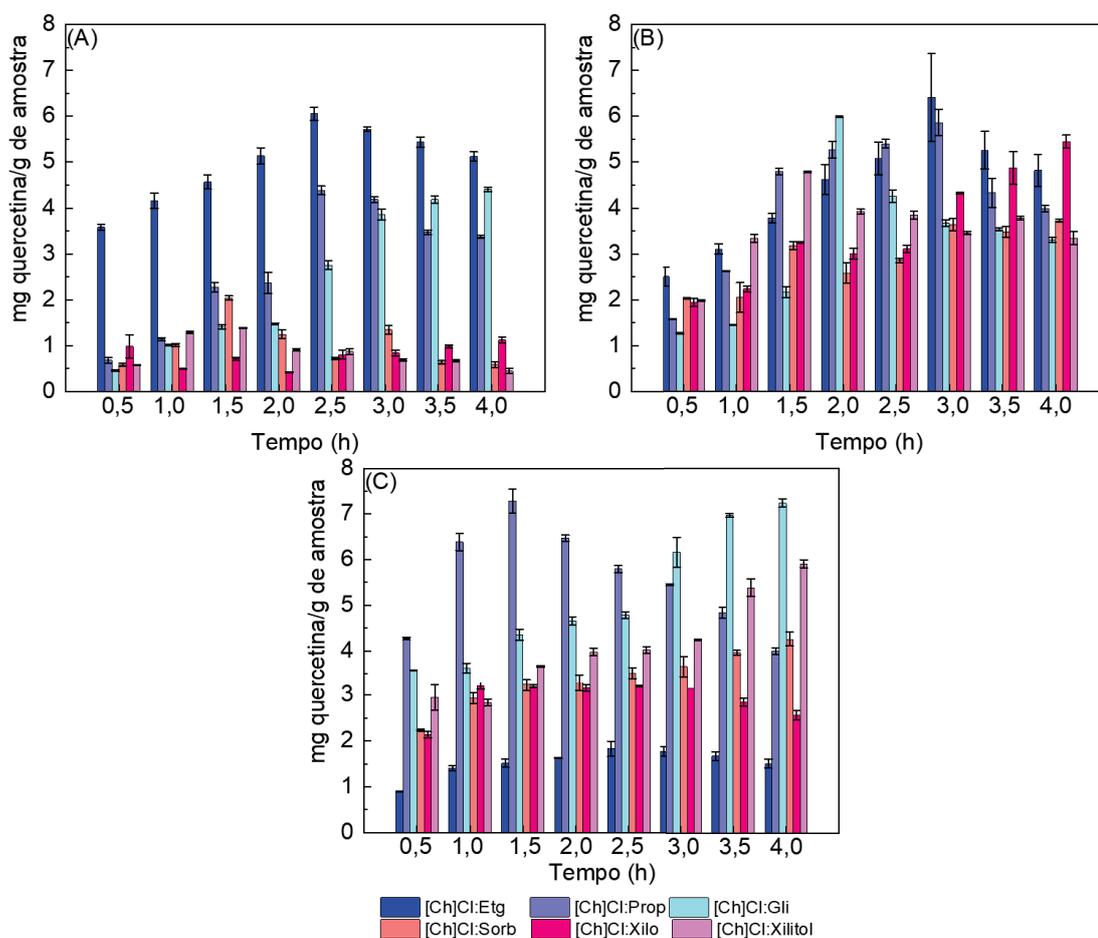
Para os DES a base de açúcar observou-se que foi necessário um maior tempo de extração para a máxima extração, variando entre duas horas e meia a três horas e meia de extração, e acima do tempo relatado houve também a redução da extração de compostos fenólicos totais. Os resultados máximos obtidos foram inferiores a 45 mg ácido gálico equivalente/ g amostra para os maiores resultados, sendo inferiores aos obtidos com os DES a base de álcool. A diferença apresentada entre os tempos de extração também está relacionada a viscosidade dos solventes utilizados.

5.3. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FLAVONOIDES TOTAIS

O teor de compostos flavonoides totais dos extratos é demonstrado na FIGURA 10. Os resultados obtidos indicam que os solventes eutéticos profundos a base de álcool (glicerol e o 1,2-propanodiol), extraíram 2 a 7 mg quercetina/ g amostra, enquanto os solventes a base de açúcar extraíram 0,5 a 5,5 mg quercetina/ g amostra. Os DES a base de álcool apresentam parte da cadeia apolar e parte polar, fazendo com que obtivesse melhor interação com os compostos flavonoides totais, devido sua maior hidrofobicidade, favorecendo a sua extração. Os DES a base de açúcar além de maior polaridade em

comparação aos compostos de interesse, apresentaram elevada viscosidade dificultando assim a extração dos flavonoides.

FIGURA 10 - EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FLAVONOIDES TOTAIS PRESENTES NA FOLHA DE GRAVIOLEIRA EMPREGANDO TECNOLOGIA ASSISTIDA POR ULTRASSOM E RAZÃO SÓLIDO-LÍQUIDO 1:20. RAZÃO MOLAR DOADOR-RECEPTOR: 2:1 PARA OS DES A BASE DE AÇÚCAR E 1:2 PARA OS DES A BASE DE ÁLCOOL. (A) T = 30 °C. (B) T = 45 °C. (C) T = 60 °C.



FONTE: O Autor (2020).

O DES [Ch]Cl:Etg extraiu um alto teor de flavonoides totais (próximo de 6 mg quercetina/ g amostra) na temperatura de 30 °C. O aumento da temperatura para 45 °C promoveu um pequeno aumento na extração deste bioativo. No entanto, quando a temperatura foi aumentada para 60 °C houve diminuição da extração de compostos

flavonoides totais pelo DES [Ch]Cl:Etg. Essa diminuição está relacionada a exposição deste composto ao estresse térmico, causando sua degradação. Para temperaturas superiores a 45 °C somente os DES de glicerol ([Ch]Cl:Gli) e 1,2-propanodiol ([Ch]Cl:Prop) apresentaram característica de alta extração e manutenção dos flavonoides apresentando valores extraídos entre 3,5 a 7,5 mg quercetina/ g amostra . A extração do teor de flavonoides utilizando o DES a base de açúcar aumentou com a temperatura, obtendo um rendimento de extração que variou entre 2,2 a 5,3 mg quercetina/ g amostra utilizando o DES proveniente do xilitol ([Ch]Cl:Xil), sendo o que apresentou maior extração dos compostos flavonoides totais.

Para efeito do tempo de extração foi possível observar que para os DES a base de álcool, como o 1,2-propanodiol e o glicerol, o tempo de maior extração foi acima de duas horas e meia apresentando valores entre 3,5 a 7,5 mg quercetina/ g amostra, sendo observado para todas as temperaturas. Para o DES a base de etilenoglicol, houve maior extração a temperatura de 30 °C, com o tempo de duas horas e meia de extração.

Para todos os DES contendo açúcar as mais altas extrações ocorreram acima de duas horas e meia obtendo valores entre 0,8 a 5,5 mg quercetina/ g amostra. Foi possível observar que os DES a base de açúcar apresentaram capacidade inferior de extração e manutenção de compostos flavonoides totais, em comparação com os DES a base de álcool para todas as temperaturas avaliadas.

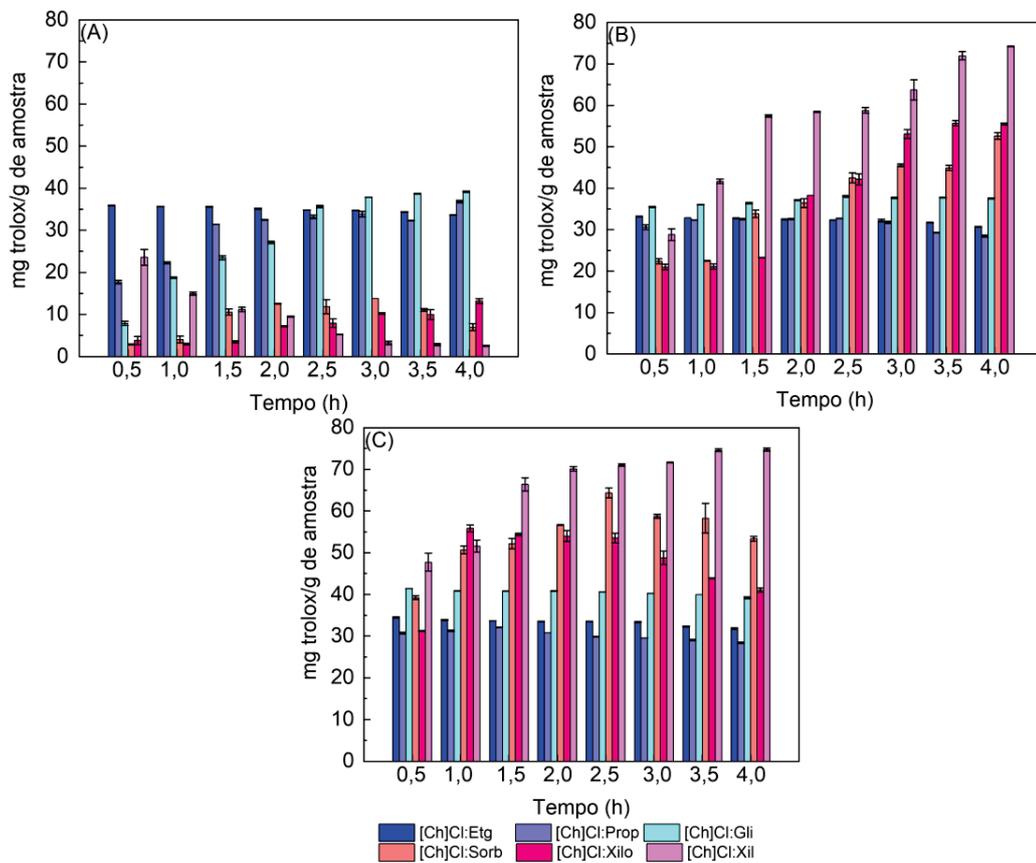
O efeito da temperatura foi mais significativo na extração dos fenóis totais do que na de flavonoides. Na extração de fenóis totais o aumento da temperatura resultou em índices de extração similares para ambos os doadores avaliados, açúcares e álcoois. Para os flavonoides entretanto, os DES compostos por álcoois apresentam melhor desempenho.

Os DES utilizados neste trabalho obtiveram valores semelhantes aos encontrados na literatura para extração de flavonoides presentes nas folhas de gravioleira (Silva 2016, Justino et al., 2018) utilizando solventes convencionais. Entretanto os solventes utilizados neste trabalho apresentam baixa ou nenhuma toxicidade, alta biodegradabilidade, simples síntese e baixo custo.

5.4. ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO METODOLOGIA DO DPPH

Os extratos foram avaliados quanto a sua capacidade antioxidante utilizando a determinação por DPPH (FIGURA 11).

FIGURA 11 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PRESENTE NA FOLHA DE GRAVIOLEIRA EMPREGANDO a TECNOLOGIA ASSISTIDA POR ULTRASSOM E RAZÃO SÓLIDO-LÍQUIDO 1:20. RAZÃO MOLAR DOADOR-RECEPTOR: 2:1 PARA OS DES A BASE DE AÇÚCAR E 1:2 PARA OS DES A BASE DE ÁLCOOL. (A) T = 30 °C. (B) T = 45 °C. (C) T = 60 °C.



FONTE: O Autor (2020).

O aumento de temperatura, de 30 °C para 45 °C, favoreceu a atividade antioxidante dos extratos obtidos pelos DES formados por açúcares. Para a temperatura de 45 °C e tempo de 4 horas foi obtido 74 mg trolox/g amostra para o [Ch]Cl:Xil, 55 mg trolox/g amostra para o [Ch]Cl:Xilo, 52 mg trolox/g amostra para o [Ch]Cl:Sorb. Ao variar a temperatura de 45 °C para 60 °C observou-se que houve manutenção da atividade antioxidante dos

extratos. Para os DES formados por álcool não houve um aumento significativo na atividade antioxidante com o aumento da temperatura, mantendo valores próximos de 30 mg trolox/g amostra, independentemente do tempo de extração.

Os resultados obtidos indicam que todos os DES compostos de açúcar como DH apresentaram maior atividade antioxidante por DPPH em comparação aos DES a base de álcool, apresentando valores acima de 70 mg trolox/g amostra na temperatura de 60 °C enquanto que para os DES a base de álcool os valores de atividade antioxidante foram inferiores a 50 mg trolox/ g amostra na temperatura de 60 °C.

Em relação ao tempo, para os DES a base de açúcar é possível observar que, na maioria das vezes, o aumento do tempo e temperatura é diretamente proporcional ao aumento da atividade antioxidante. Para os solventes eutéticos profundos a base de álcool somente a temperatura foi significativa para a atividade antioxidante.

Em comparação com as análises de fenólicos totais, a atividade antioxidante por DPPH apresentou semelhanças devido ao aumento da atividade antioxidante dos DES a base de açúcares com o aumento da temperatura. No entanto, para os DES a base de álcool a atividade antioxidante manteve-se constante apesar do aumento na extração de compostos fenólicos totais.

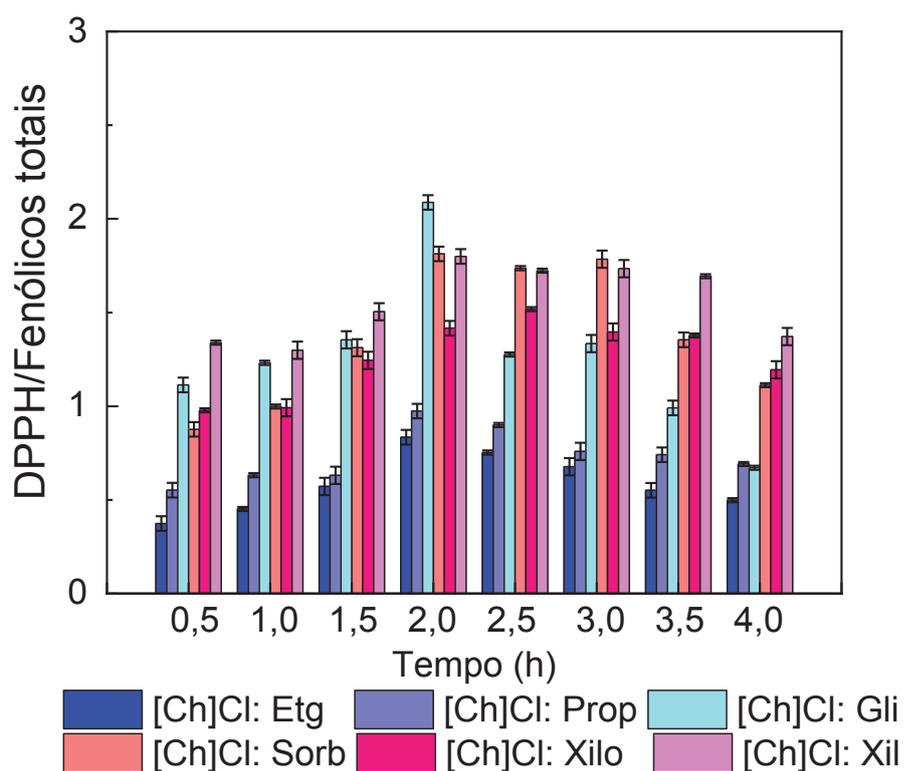
5.5. AVALIAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO UTILIZANDO ULTRASSOM

A escolha da temperatura foi avaliada em termos da atividade antioxidante (DPPH), flavonoides totais e dos compostos fenólicos totais. Foi observado que na temperatura de 45 °C foi obtido a maior extração do teor de fenóis totais apresentando valores máximos acima de 45 mg ácido gálico equivalente/ g amostra, flavonoides (valores máximos acima de 6 mg quercetina/ g amostra) e alta atividade antioxidante (valores máximos acima de 70 mg trolox/ g amostra).

O tempo de extração foi determinado, fixada a temperatura em 45 °C, por meio da razão entre a capacidade antioxidante (DPPH e FRAP) e fenóis totais (FIGURAS 12 e 13). Pode -se observar que acima de duas horas de extração a razão DPPH/ Fenóis totais diminui para todos os DES, apresentando valores inferiores a 2. Em relação a atividade antioxidante FRAP/Fenólicos totais pode-se observar comportamento

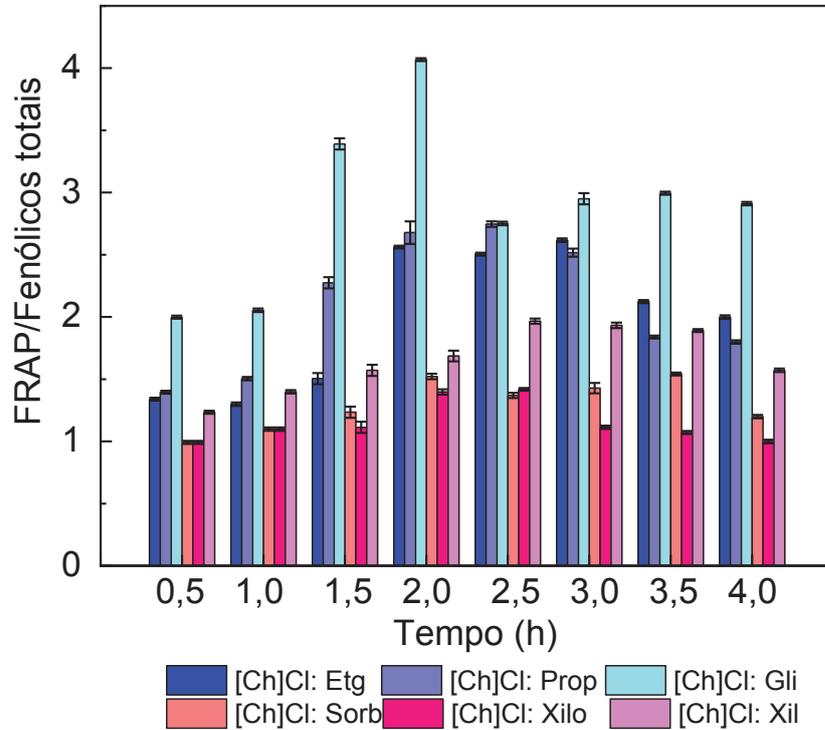
semelhante para todos os DES empregados. Assim, foi possível determinar o tempo de extração por meio das maiores razões, selecionando duas horas de extração.

FIGURA 12 - AVALIAÇÃO DA RAZÃO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES (DPPH/ FENÓIS TOTAIS) NA TEMPERATURA DE 45 °C UTILIZANDO DIFERENTES DES, COM RAZOES MOLARES DOADOR-RECEPRTOR DE 2:1 PARA OS DES A BASE AÇÚCAR 1:2 E PARA OS DES A BASE DE ÁLCOOL.



FONTE: O Autor (2020).

FIGURA 13 - AVALIAÇÃO DA RAZÃO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES (FRAP/ FENÓLICOS TOTAIS) NA TEMPERATURA DE 45 °C UTILIZANDO DIFERENTES DES, COM RAZOES MOLARES DOADOR-RECEPRTOR DE 2:1 PARA OS DES A BASE AÇÚCAR 1:2 E PARA OS DES A BASE DE ÁLCOOL.

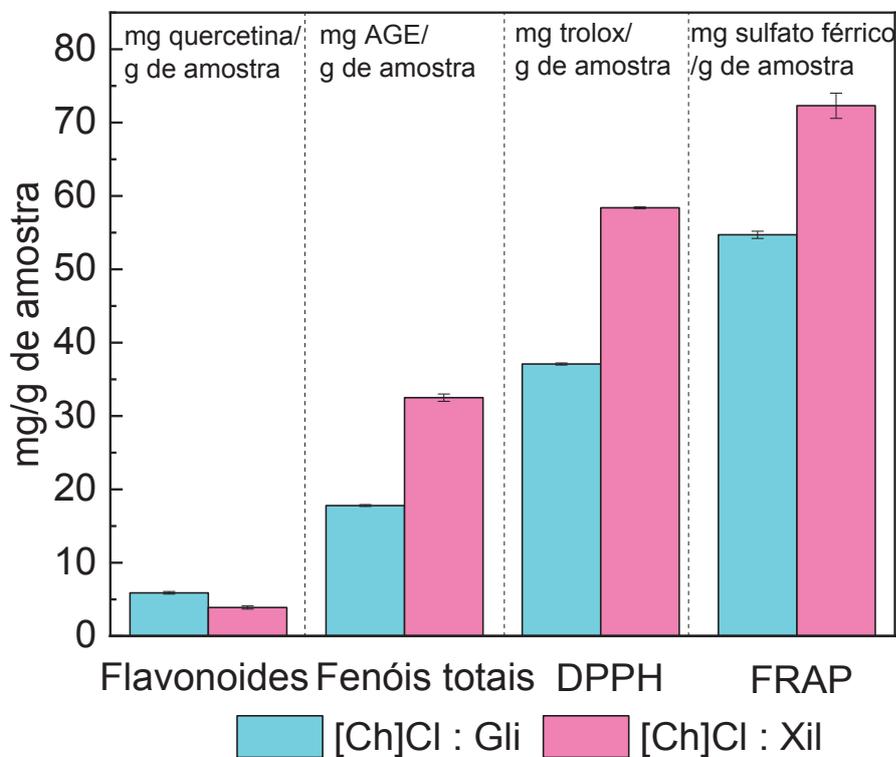


FONTE: O Autor (2020).

Foram escolhidos dois solventes eutéticos profundos, um deles sendo composto de álcool e um de açúcar sendo a temperatura de 45 °C e tempo de 2 horas de extração. De acordo com os resultados apresentados nas FIGURAS 12 e 13 foram definidos os DES [Ch]Cl:Gli e [Ch]Cl:Xil.

As comparações entre os solventes escolhidos são apresentados na FIGURA 14. Observa-se que o DES [Ch]Cl:Xil apresentaram maior rendimento de extração em comparação ao [Ch]Cl:Gli obtendo 32,5 mg ácido gálico equivalente/amostra, 58 mg trolox/g amostra, 72,3 mg sulfato férrico/ g amostra nas análises de fenóis totais, DPPH e FRAP, respectivamente. No entanto para os compostos flavonoides totais foi evidenciado uma maior presença no DES a base de álcool, devida maior hidrofobicidade dos flavonoides, apresentando maior afinidade com o solvente.

FIGURA 14 - COMPARAÇÃO ENTRE AS MELHORES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO EMPREGANDO OS DES.



FONTE: O Autor (2020).

A TABELA 6 apresenta os resultados obtidos neste trabalho em comparação aos resultados obtidos na literatura, para fenóis totais.

TABELA 6 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS DE MELHORES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO COM OS DADOS PRESENTES NA LITERATURA.

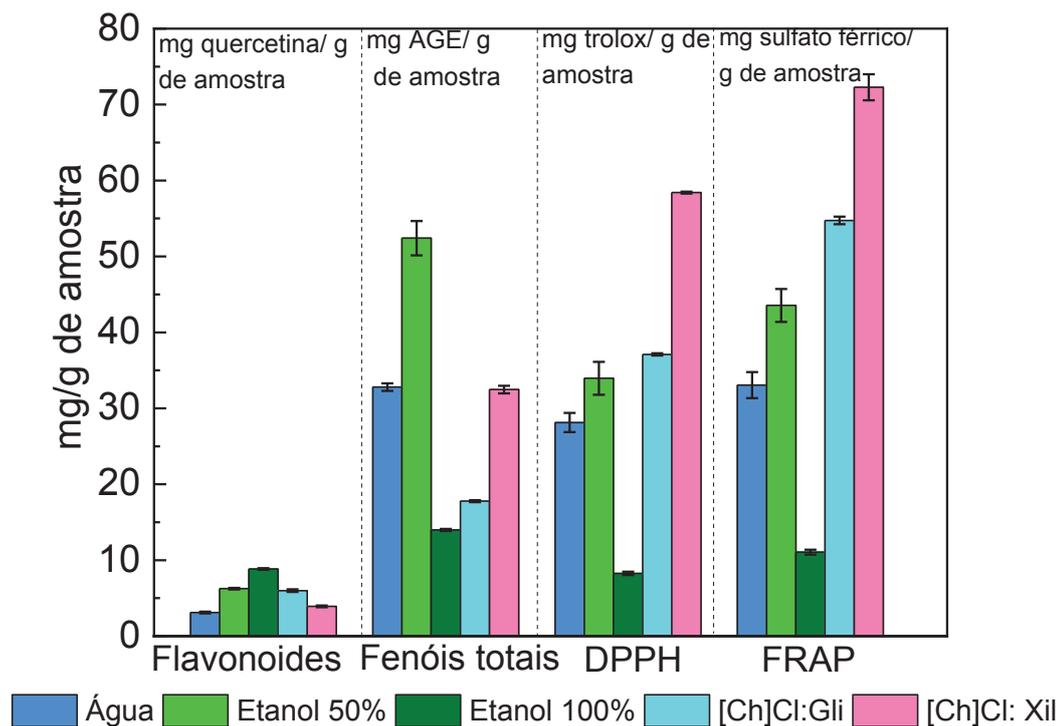
Solvente	Fenóis totais (mg AGE/ g de amostra)	Autor
[Ch]Cl:Gli	17,76 ± 0,12	Presente trabalho
[Ch]Cl:Xil	32,46 ± 0,50	Presente trabalho
Metanol	36,20 ± 0,36	George et al. (2014)
Etanol	19,10 ± 0,14	George et al. (2014)
Acetato de etila	227,00 ± 0,87	Justino et al., 2018*
n-butanol	132,60 ± 5,13	Justino et al., 2018*

*Os altos índices de extração foram provenientes à concentração dos extratos.

Os resultados provenientes da extração de compostos fenólicos com os DES apresentaram-se próximos, e em alguns casos superiores aos valores de fenóis totais obtidos por solventes convencionais comumente utilizados. No entanto, o emprego dos DES na extração apresenta baixa toxicidade e alta biodegradabilidade, além de uma melhor qualidade do extrato.

Além da comparação entre os DES selecionados foram também efetuadas comparações com solventes convencionais empregados na extração, tais como água, etanol e a mistura entre etanol e água (50% volume/volume) empregando as mesmas condições dos DES (FIGURA 15).

FIGURA 15 - COMPARAÇÃO ENTRE A QUANTIDADE DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES EXTRAÍDOS APLICANDO SÓLVENTES CONVENCIONAIS E OS DES, A 45°C E DUAS HORAS DE EXTRAÇÃO EMPREGANDO EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM.



FONTE: O Autor (2020).

Os resultados apresentados na Figura 15 indicam que apesar do solvente etanol 50% apresentar uma maior capacidade de extração dos compostos fenólicos totais e

compostos flavonoides, os extratos obtidos com os DES apresentaram uma maior atividade antioxidante por DPPH e FRAP. Desse modo foi possível verificar que além de uma tecnologia com características verdes, os DES foram capazes de manter a atividade antioxidante dos extratos possuindo índices superiores aos solventes convencionais empregados, tais como água, etanol e etanol 50%.

5.6. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FENÓLICO (HPLC-DAD)

O perfil fenólico dos DES provenientes de glicerol e xilitol foram obtidos por HPLC-DAD na qual foram encontrados dois compostos principais, sendo eles a rutina e a catequina (TABELA 7).

TABELA 7 - VALORES OBTIDOS DE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS SELECIONADOS EMPREGANDO OS DES [CH]CL:GLI E [CH]CL:XIL POR HPLC-DAD.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g}/\text{grama de amostra}$)	
	Rutina	Catequina
[Ch]Cl:Gli	$0,259 \pm 0,01$	$0,238 \pm 0,31$
[Ch]Cl:Xil	$0,293 \pm 0,08$	$0,116 \pm 0,06$

FONTE: O Autor (2020).

Os compostos identificados (rutina e catequina) nos extratos empregando os solventes [Ch]Cl:Gli e [Ch]Cl:Xil são da classe dos flavonoides e apresentam alta capacidade antioxidante, impedindo a formação de radicais livres (JUSTINO et al., 2018; MANCINI et al., 2018). O DES que utilizou o glicerol como doador de hidrogênio apresentaram maior afinidade com os compostos flavonoides totais ($5,98 \text{ mg quercetina}/\text{g amostra}$) em relação ao DES a base de xilitol ($3,92 \text{ mg quercetina}/\text{g amostra}$) (FIGURA 14), estando de acordo com os resultados obtidos por HPLC. Para ambos os extratos foi identificada uma concentração maior de catequina, em relação a rutina, sendo esta concentração superior no extrato obtido como DES a base de álcool. Isso se deve a maior interação apresentada pela catequina com o DES a base de álcool, devido a alta hidrofobicidade apresentada pelo flavonoide apresentando características semelhantes ao DES a base de álcool (FIGURA 10B).

Além disso, pode-se utilizar indicativo de polaridade, o $\log K_{(ow)}$, para avaliar a extração da catequina, pois quanto maior o $\log K_{(ow)}$, maior a hidrofobicidade da molécula

em questão. A molécula de catequina apresenta o $\log K_{(ow)} = +0,852$ e os DH apresentaram o $\log K_{(ow)}$ nos valores de $-1,88$ e $-3,22$, respectivamente para glicerol e xilitol. De tal forma, é possível identificar a maior interação entre a catequina e o DES a base de álcool, obtendo altas taxas de extração.

Os valores obtidos neste trabalho para a catequina foram superiores ao de Mancini e colaboradores (2018) que detectaram $1,93 \pm 0,03 \mu\text{g/L}$ no extrato aquoso da folha de gravioleira. No entanto, para a rutina Mancini et al. (2018) apresentou valores superiores ($4,11 \pm 0,01 \mu\text{g/L}$) ao deste trabalho. Desta forma, é possível observar a maior interação do flavonoide rutina com a água em comparação com os DES.

5.7. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO EXTRATO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO

De acordo com a literatura, a folha de gravioleira apresenta compostos com ação antimicrobiana como o tetrahidrofurano (THF) anonacina (CHEN et al., 2012; HAMIZAH, et al., 2012; MOGHADAMTOUSI et al., 2015). Desta forma, foi utilizado o teste antimicrobiano de halo de inibição com a intenção de verificar tal ação antibacteriana.

Foram aplicados os extratos selecionados obtidos a 45°C e duas horas de extração, empregando os DES compostos por glicerol e xilitol como doadores de hidrogênio em bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocitogenes*) e gram-negativas (*Salmonella spp.*, *Escherichia coli*). Para avaliar o potencial antimicrobiano, os diâmetros inibitórios formados ao redor do disco inoculado com o extrato foram medidos e comparados os resultados com o antibiótico utilizado.

A TABELA 8 apresenta os diâmetros de inibição identificados para a amostra do [Ch]Cl:Xil para solvente puro e extrato, sendo que somente este apresentou capacidade antimicrobiana. De acordo com o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (*The Clinical and Laboratory Standards Institute*), a ação antimicrobiana foi classificada em susceptível (S, halos de inibição maiores de 18 mm), intermediário (I, halos de inibição entre 13 a 17 mm) e resistentes (R, valores menores que 12 mm de halo de inibição) (CLSI, 2016).

TABELA 8 - VALORES OBTIDOS DE INIBIÇÃO DO EXTRATO E DO SOLVENTE UTILIZADO PROVENIENTE DO DES A BASE DE XILITOL EMPREGANDO TEMPERATURA DE 45°C E DUAS HORAS DE EXTRAÇÃO.

Bacteria	Milímetros de inibição do extrato	Milímetros de inibição do DES	Milímetros de inibição do antibiótico	Potencial antimicrobiano
<i>Listeria monocytogenes</i>	12.10 ± 0.09	11.34 ± 0.34	28,373 ± 0,02	R*
<i>Clostridium perfringens</i>	11.18 ± 0.10	10.38 ± 0.29	28,373 ± 0,21	R*
<i>Staphylococcus Aureus</i>	14.16 ± 0.21	7.4 ± 0.44	28,883 ± 0,11	I*

FONTE: O Autor (2020).

Os extratos obtidos utilizando solventes convencionais, tais como etanol 100%, etanol 50% e água e os extratos obtidos empregando as melhores condições de extração com DES foram aplicados no teste antimicrobiano. No entanto, apenas o extrato de DES (ChCl:Xil) apresentou atividade bactericida. Isso pode ser explicado devido a concentração extraída de fenóis totais (32,46 mg ácido gálico equivalente/ g amostra) e alta atividade antioxidante (58,41 mg trolox/ g amostra) presente no extrato, o que auxiliou na atividade antimicrobiana.

Para a bactéria *Staphylococcus Aureus*, houve inibição intermediária do extrato, sendo o que de acordo com o seu diâmetro de halo, em comparação ao diâmetro do halo do antibiótico, houve uma inibição de aproximadamente 50%.

Entre os vários compostos com atividade antimicrobiana, os compostos fenólicos com grupos hidroxila interagem com a membrana dos microrganismos, destruindo-a. Isso ocorre devido aos grupos hidroxila que deslocam os elétrons, reduzindo o gradiente na membrana citoplasmática das células, causando a morte celular (GYAWALI e IBRAHIM, 2014; ULTEE et al., 2002). Além disso, os mesmos grupos podem se ligar a locais ativos de enzimas essenciais para o metabolismo bacteriano impedindo seu funcionamento (CARDOSO et al., 2019; KHALIL et al., 2018). Outro fator importante é a atividade antioxidante, devido a diminuição de formação de espécies reativas de oxigênio, reduzindo o potencial de redução, retardando o crescimento bacteriano (KHALIL et al., 2018; ULTEE et al., 2002).

Pinto e colaboradores (2017) relataram a ação de compostos bioativos presentes na folha de gravioleira mostrando ação em bactérias gram-positivas e gram-negativas. De tal forma, uma das bactérias mais suscetíveis à ação de compostos bioativos foi o *Staphilococcus Aureus*.

O DES mostrou potencial de inibição a todas as bactérias gram-positivas, porém, quando empregado com o extrato, houve uma potencialização do efeito. Entre as bactérias selecionadas, o maior potencial de inibição encontrado foi avaliado como intermediário, sendo observado para a bactéria *Staphylococcus Aureus*.

6. CONCLUSÕES

Durante o desenvolvimento do trabalho avaliou-se a aplicabilidade do processo de extração sólido-líquido assistida por ultrassom utilizando solventes verdes para a obtenção de compostos bioativos presentes nas folhas de gravioleira. Para isso, DES formados cloreto de colina como receptor de hidrogênio e diferentes doadores de hidrogênio (etilenoglicol, 1,2-propanodiol, glicerol, sorbitol, xilose e xilitol) foram avaliados.

Diferentes condições de tempo e temperatura de extração, em termos do teor de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante dos extratos obtidos. Levando em conta esses parâmetros, a temperatura de 45 °C e o tempo de extração de 2 horas foram considerados os mais adequados dentre os avaliados. Quanto a natureza dos DES avaliados, aqueles compostos por glicerol e xilitol se destacaram frente aos demais DES utilizados, principalmente no que diz respeito a atividade antioxidante dos extratos obtidos, a qual foi avaliada por meio de DPPH e FRAP.

Quando comparada a capacidade extrativa do DES com um solvente dito convencional, tais como etanol (100 %) e a solução etanol: água (50% v/v), maior atividade antioxidante foi obtida para as extrações com DES compostos por glicerol e xilitol como doadores de hidrogênio. Esses resultados sugerem que além da alta biocompatibilidade e biodegradabilidade conferida a esses solventes na literatura apresentam ainda alta capacidade para extração de compostos bioativos e podem promover ainda um efeito protetor aos compostos extraídos inibindo sua degradação, mesmo em altas temperaturas. Além disso, os extratos obtidos pelos DES foram empregados no teste antimicrobiano por halo de inibição, no qual o extrato puro obtido com xilitol apresentou atividade antibacteriana intermediária para o *Staphylococcus Aureus*

Os solventes aqui propostos demonstraram ser de potencial aplicação para obtenção de compostos bioativos e conseqüente valorização de matérias-primas subutilizadas como as folhas de matrizes vegetais.

Por fim, como possível sugestão para trabalhos futuros seria o emprego dos extratos para possíveis análises antiglicantes e análises *in vivo* para ação inseticida em mosquitos e larvas.

6.1. Produção científica

FARIAS, F.O.; OLIVEIRA, G.; LEAL, F. C.; WOJEICCHOWSKI, J. P.; YAMAMOTO, C.I.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M.R.; Cholinium chloride effect on ethanol-based aqueous biphasic systems: Liquid-liquid equilibrium and biomolecules partition behavior. **Fluid Phase Equilibria**,v. 505, 2020.

6.2. Trabalhos apresentados em eventos

Congresso Brasileiro de Termodinâmica aplicada: Apresentação de Trabalho

OLIVEIRA, G.; DIAS, M. C. G. C.; LEAL, F. C.; FARIAS, F.O.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R. Biomolecules solubility in cholinium chloride aqueous solutions at 298.15 K, **X CBTermo**, 2019.

Congresso Brasileiro de Termodinâmica aplicada: Apresentação de Trabalho

OLIVEIRA, G.; DIAS, M. C. G. C.; LEAL, F. C.; FARIAS, F.O.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R. Obtain of bioactive compounds from Soursop leaves (*Annona muricata* L.) with deep eutectic solvents by ultrassound-assisted extraction waves, **X CBTermo**, 2019.

Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos :Apresentação de trabalho. LEAL, F.C.; FARIAS, F. O.; AMARAL, W.; MAFRA, M.R.; IGARASHI-MAFRA, L. Solid liquid extraction to obtain phenolic compounds for soursop leaves (*Annona muricata* Linnaeus) with ethanol and deep eutectic solvents, **XV ERSCTA**, 2019.

Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos: Apresentação de trabalho.

LEAL, F. C.; FARIAS, F.O.; MAFRA, M. R.; IGARASHI-MAFRA, L. Ultrassound-Assisted waves extraction to obtain bioactive compounds for Soursop leaves (*Annona muricata* L.) with glycerol-based deep eutectic solvents, **13° SLACA**, 2019.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, A. P.; BOOTHBY, D.; CAPPER, G.; DAVIES, D. L.; RASHEED, R. K. Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. **Journal of the American Chemical Society, Washington**, v. 126, n. 29, p. 9142-9147, 2004.

ABBOTT, A. P.; CAPPER, G.; DAVIES, D. L.; RASHEED, R. K.; TAMBYRAJAH, V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. **Chemical Communications**, p. 70-71, 2003.

ADAB. Agência de Defesa Agropecuária da Bahia. Disponível em: <<http://www.adab.ba.gov.br>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

AGUILAR-HERNÁNDEZ, G.; GARCIA-MAGAÑA, M, L.; VIVAR-VERA, M, L, A.; SAYÁGO-AYERDI, S, G.; SÁNCHEZ-BURGOS, J, A.; MORALES-CASTRO, J.; ANAYA-ESPARZA, L, M.; GONZÁLES, E, M. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from *Annona muricata* By-Products and Pulp. **Molecules**, [s.l.], v. 24, n. 5, p.904-915, 2019.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 17^aed. Washington, 2005.

ALALI, F. Q.; LIU, X.-X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products**, 62, p. 504-540, 1999.

ALI, M.C.; CHEN, J.; ZHANG, H.; LI, Z.; ZHAO, L.; QIU, H. Effective extraction of flavonoids from *Lycium barbarum* L. fruits by deep eutectic solvents-based ultrasound-assisted extraction. **Talanta**. v. 203, 16–22, 2019.

ALOMAR, M.K., HAYYAN, M., ALSAADI, M.A., AKIB, S., HAYYAN, A., HASHIM, M.A., Glycerol-based deep eutectic solvents: Physical properties. **Journal of Molecular Liquids** 215, 98–103, 2016.

ALONSO, C.; DOMÍNGUEZ, C.; HERAS, J.; MATA, E.; PASCUAL, V.; TORRES, C.; ZARAZAGA, M. Antibioqramj: A tool for analysing images from disk diffusion tests. **Computer Methods And Programs In Biomedicine**, [s.l.], v. 143, p.159-169, 2017.

AL-QASSABI, J. S. A.; WELI, A. M.; HOSSAIN, M. A. Comparison of total phenols content and antioxidant potential of peel extracts of local and imported lemons samples. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**. v. 8, p. 71-75, 2018.

ALVAREZ, L, V, H.; ZIELINSKI, A, A, F.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A. Monitoring of the phenolic compounds and in vitro antioxidant activity of apple beverages according to

geographical origin and their type: A chemometric study. **Lwt- Food Science and Technology**, v. 84, p.385-393, 2017.

AYDIN, F.; YILMAZ, E.; SOYLAK, M. Vortex assisted deep eutectic solvent (DES)-emulsification liquid-liquid microextraction of trace curcumin in food and herbal tea samples. **Food Chemistry**, v. 243, p. 442-447, 2018.

BADRIE, N., SCHAUSS, A.G. Soursop (*Annona muricata* L.): Composition, nutritional value, medicinal uses, and toxicology. In Watson, R.R., Preddy, V.R. (eds.) *Bioactive Foods in Promoting Health. Fruits and Vegetables*. **Oxford: Academic Press**, p. 621-643, 2009.

BAKIRTZI, C; TRIANTA, F. K.; MAKRIS, D. P. Novel lactic acid-based natural deep eutectic solvents: Efficiency in the ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from common native Greek medicinal plants, **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3, 2016.

BARBIERI, J, B. Aplicação de solventes eutéticos profundos (DES) na extração sólido-líquido de compostos fenólicos presentes no alecrim (*Rosmarinus Officinalis*). 2018. 69 f. **Dissertação (Mestrado)** - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

BARBIERI, J.B.; GOLTZ, C.; CAVALHEIRO, F. B.; TOCI, A.T.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M.R. Deep eutectic solvents applied in the extraction and stabilization of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) phenolic compounds. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 144, p.112-049, 2020.

BAUER, A, W.; KIRBY, W, M, M.; SHERRIS, J, C.; TURCK, M. Antibiotic and susceptibility testing by a standardized single disk method. **The American Journal of Clinical Pathology**, 1966.

BELMIRO, T.M.C.; PEREIRA, C.F.; PAIM, A.P.S. Red wines from South America: Content of phenolic compounds and chemometric by origin. **Microchemical Journal**, 133, 114-120, 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2005c). Regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinha e farelos (Resolução RDC nº 263 de 22 de setembro de 2005).

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

CAI, C., LI, F., LIU, L., TAN, Z. Deep eutectic solvents used as the green media for the efficient extraction of caffeine from Chinese dark tea. **Separation and Purification Technology**. 227, 115-723, 2019.

CAO, J.; CHEN, L.; LI, M.; CAO, F.; ZHAO, L.; SU, E. Efficient extraction of proanthocyanidin from *Ginkgo biloba* leaves employing rationally designed deep eutectic solvent-water mixture and evaluation of the antioxidant activity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 158, p. 317-326, 2018.

CARBAJAL, D.; CASACO, A.; ARRUZAZABALA, L.; GONZALEZ, R.; FUENTES, V.. Pharmacological screening of plant decoctions commonly used in Cuban folk medicine. **Journal of ethnopharmacology**, 33, 21-24, 1991.

CÁRCEL, J. A.; PÉREZ, J. V. G.; BENEDITO, J.; MULET, A. Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 200-207, 2012.

CARDOSO, T., MARQUES, C., RAQUEL, A., DAGOSTIN, A., LUCIA, M. Characterization of lactobionic acid evidencing its potential for food industry application. **Journal of Food Process Engineering**. p.1–11, 2019.

CASTRO, M. D. L.; PRIEGO-CAPOTE, F.; PERALBO-MOLINA, A. The role of ultrasound in analytical derivatizations. **Journal of Chromatography B**, v. 897, p. 1189-1195, 2011.

CHAN, C.; XIE, X.; WAN, S.; ZHOU, G.; YUEN, A, C.; MOK, D, K.; CHEN, S. Qualitative and quantitative analysis of sesquiterpene lactones in *Centipeda minima* by UPLC–Orbitrap–MS & UPLC–QQQ–MS. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 174, p.360-366,2019

CHANDRAN, D.; KHALIDA, M.; WALVEKAR, R.; MUBARAK, N. M.; DHARASKARD, S.; WONGE, W. Y.; GUPTA, T. C. S. M. Deep eutectic solvents for extraction of desulphurization: A review. **Journal of Molecular Liquids**, v. 275, p. 312-322, 2019.

CHANIOTI, S.; TZIA, C. Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. 48, 228–239, 2018.

CHEMAT, F.; HUMA, Z.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonic Sonochemistry**, v. 18, p. 813-835, 2011.

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

CHEN, X.; WANG, W.; WANG, C.; LIU, J.; SUN, Q.; WANG, D. Quality evaluation and chemometric discrimination of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim leaves based on

flavonoids profiles, bioactivity and HPLC-fingerprint in a common garden experiment. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 134, p.225-233, 2019.

CHEN, Y.; CHEN, J.-W.; XU, S.-S.; WANG, Y.; LI, X.; CAI, B.-C.; FAN, N.-B. Antitumor activity of annonaceous acetogenins in HepS and S180 xenografts bearing mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 22, p. 2717-2719, 2012.

CHEN, Y.; MU, T. Application of deep eutectic solvents in biomass pretreatment and conversion. **Green Energy & Environment**, [s.l.], v. 4, n. 2, p.95-115, 2019.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100-S26**; 26th informational supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.

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**, [s.l.], v. 11, n. 5, p.662-691,2018.

CUJIC, N.; ŠAVIKIN, K.; JANKOVIC, T.; PLJEVLJAKUSIC, D.; ZDUNIC, G. IBRIC, S. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. **Food Chemistry**. v. 194, p. 135–142, 2016.

CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O. Extraction techniques with deep eutectic solvents. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 105, p. 225-239, 2018.

DAI, Y.; SPRONSEN, J. V.; WITKAMP, G. J.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Natural Deep Eutectic Solvents as new potential media for green technology. **Analytica Chimica Acta**, v. 766, p. 61-68, 2013.

DAMMAK, M. I.; CHAKROUN, I.; MZOUGH, Z.; AMAMOU, S.; MANSOUR, H. B.; CERF, D. L.; MAJDOUB, H. Characterization of polysaccharides from *Prunus amygdalus* peels: Antioxidant and antiproliferative activities. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 119, p. 198-206, 2018.

DUAN, L., DOU, L.L., GUO, L., LI, P., LIU, E.H. Comprehensive Evaluation of Deep Eutectic Solvents in Extraction of Bioactive Natural Products. **ACS Sustainable Chemical Engineering**. 4, 2405–241, 2016.

EL KANTAR, S., RAJHA, H.N., BOUSSETTA, N., VOROBIEV, E., MAROUN, R.G., LOUKA, N.,. Green extraction of polyphenols from grapefruit peels using high voltage electrical discharges, deep eutectic solvents and aqueous glycerol. **Food Chemistry**. 295, 165–171, 2019.

ELIZABETH, O, O.; NONSO, I, F.; MZOUGH, Z.; ADEBOLA, N, I.; JOHN, O. J. Comparative Study on Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Annona*

Muricata Plant Parts Cultivated in Covenant University, Ota, Ogun State, Nigeria. **Current Research in Nutrition and Food Science**. v. 06, p. 807- 815, 2018.

FARIAS, F, O.; PASSOS, H.; LIMA, Á, S.; MAFRA, M, R.; COUTINHO, J, A, P. Is It Possible To Create Ternary-like Aqueous Biphasic Systems with Deep Eutectic Solvents? **Acs Sustainable Chemistry & Engineering**, [s.l.], v. 5, n. 10, p.9402-9411, 2017.

FARIAS, F, O.; PASSOS, H.; COUTINHO, J, A, P.; MAFRA, M, R. The pH Effect on the Formation of Deep-Eutectic-Solvent-Based Aqueous Two-Phase Systems. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, [s.l.], v. 57, n. 49, p.16917-16924, 2018.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema** – 4ª ed. - Editora Artmed, 2010.

FERNÁNDEZ, M. DE LOS Á., ESPINO, M., GOMEZ, F.J.V., SILVA, M.F. Novel approaches mediated by tailor-made green solvents for the extraction of phenolic compounds from agro-food industrial by-products. **Food Chemistry**. 239, 671–678, 2018.

FIGUEROA, J.G.; BORRÁS-LINARES, I.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; SEGURA-CARRETERO, A. Comprehensive characterization of phenolic and other polar compounds in the seed and seed coat of avocado by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. **Food Research International**, [s.l.], v. 105, p.752-763, 2018.

FLORENCE, N.T., BENOIT, M.Z., JONAS, K., ALEXANDRA, T., DESIRE, D.D.P., PIERRE, K., THEOPHILE. D. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacol.**, 151, p. 784-790, 2014.

FRANKEL, E.N. Lipid oxidation. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v.19, n.1-2, p.1-22, 1980.

FU, C.; YU, P.; WANG, M.; QIU, F. Phytochemical analysis and geographic assessment of flavonoids, coumarins and sesquiterpenes in *Artemisia annua* L. based on HPLC-DAD quantification and LC-ESI-QTOF-MS/MS confirmation. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 312, p.126-137, 2020.

GAGLIANO, J.; GROMBONE-GUARATINI, M.t.; FURLAN, C. M. Antioxidant potential and HPLC-DAD profile of phenolic compounds from leaves and culms of *Merostachys pluriflora*. **South African Journal Of Botany**, [s.l.], v. 115, p.24-30, 2018.

GARCÍA, A., RODRÍGUEZ-JUAN, E., RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, G., RIOS, J.J., FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J. Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESS). **Food Chemistry**. 197, 554–561, 2016.

GARCÍA-SALAS, P.; GÓMEZ-CARAVACA, A.; 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**, [s.l.], v. 78, p.246-257, 2015.

GEORGE, V.C., KUMAR, D.R., SURESH, P.K., KUMAR, R.A. Antioxidant, DNA protective efficacy and HPLC analysis of *Annona muricata* (soursop) extracts. **Journal Food Science Technology** 52 (4), p. 2328–2335, 2014.

GOLTZ, C. Avaliação da extração de compostos fenólicos de *Achyrocline satureioides* utilizando solventes orgânicos e solventes eutéticos profundos. 2018. 120 f. **Tese (Doutorado)** - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

GOMES, S.V.F.; PORTUGAL, L.A.; ANJOS, J.P.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, E.J.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species. **Microchemical Journal**, [s.l.], v. 132, p.28-35, 2017.

GONÇALVES, A.L. Estudo da atividade antimicrobiana de algumas árvores medicinais nativas com potencial de conservação/recuperação de florestas tropicais. 209p. **Tese de Doutorado** em Ciências Biológicas – Universidade Paulista, 2007.

GULLÓN, B.; MUÑIZ-MOURO, A.; LÚ-CHAU, T, A.; MOREIRA, M, T.; LEMA, J, M.; EIBES, G. Green approaches for the extraction of antioxidants from eucalyptus leaves. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 138, p.111-473, 2019.

GYAWALI, R., IBRAHIM, S.A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control** v.46, p. 412–429, 2014.

HALLIWEL, B. Antioxidants and human disease: A general introduction. **Nutrition Reviews**. v.55, n.1, p. 44-52, 1997.

HAMIZAH, S.; ROSLIDA, A.; FEZAH, O.; TAN, K.; TOR, Y.; TAN, C. Chemopreventive potential of *Annona muricata* L. leaves on chemically-induced skin papillomagenesis in mice. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, 13, p. 2533-2539, 2012.

HAUBERT, L.; ZEHETMEYR, M, L.; PEREIRA, Y, M, N.; KRONING, I, S.; MAIA, D, S, V.; SEHN, C, P.; LOPES, G, V.; LIMA, A, S.; SILVA, W, P. Tolerance to benzalkonium chloride and antimicrobial activity of *Butia odorata* Barb. Rodr. extract in *Salmonella* spp. isolates from food and food environments. **Food Research International**, [s.l.], v. 116, p.652-659, 2019.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). Procedimentos e determinações gerais. In. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 1. Ed. Digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, p. 83-158, 2008.

JIANG, Z.M., WANG, L.J., GAO, Z., ZHUANG, B., YIN, Q., LIU, E.H. Green and efficient extraction of different types of bioactive alkaloids using deep eutectic solvents.

Microchemical Journal, 145, 345–353, 2019.

JIANG, Z.; YUAN, J.; WANG, P.; FAN, X.; XU, J.; WANG, Q.; ZHANG, L. Dissolution and regeneration of wool keratin in the deep eutectic solvent of choline chloride-urea.

International Journal of Biological Macromolecules, v. 119, p. 423-430, 2018.

JORGENSEN, J.H.; FERRARO, M.J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 49, n. 11, p.1749-1755, 2009.

JUSTINO, A, B.; MIRANDA, N, C.; FRANCO, R, R.; MARTINS, M, M.; SILVA, N, M.; ESPINDOLA, F, S. Annona muricata Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against α -amylase, α -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 100, p.83-92, 2018.

KHALIL, N.; ASHOUR, M.; FIKRY, S.; SINGAB, A, N.; SALAMA, O. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of selected Apiaceous fruits. **Future Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.88-92, 2018.

KHEZELI, T; DANESHFAR, A; SAHRAEI, R. A green ultrasonic-assisted liquid–liquid microextraction based on deep eutectic solvent for the HPLC-UV determination of ferulic, caffeic and cinnamic acid from olive, almond, sesame and cinnamon oil. **Talanta**, [s.l.], v. 150, p.577-585, 2016.

LEE, K, H.; LEE, J, S.; KIM, E, S.; LEE, H, G. Preparation, characterization, and food application of rosemary extract-loaded antimicrobial nanoparticle dispersions. **Lwt-Food Science and Technology**, [s.l.], v. 101, p.138-144, 2019.

LIU, Y.; LI, J.; FU, R.; ZHANG, L.; WANG, D.; WANG, S. Enhanced extraction of natural pigments from *Curcuma longa* L. using natural deep eutectic solvents. **Industrial Crops & Products**. v.140, 111620, 2019.

MACHEFER, G.; GROUSSARD, C.; RANNOU-BEKONO, F.; ZOUHAL, H.; FAURE, H.; VICENT, S.; CILLARD, J.; GRATAS-DELAMARCHE, A. Extreme Running Competition Decreases Blood Antioxidant Defense Capacity. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. 4, p. 358-364, 2004.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, p. 214-222, 2009.

MANCINI, S.; NARDO, L.; GREGORI, M.; RIBEIRO, I.; MANTEGAZZA, F.; DELERUE-MATOS, C.; MASSERINI, M.; GROSSO, C. Functionalized liposomes and phytosomes

loading *Annona muricata* L. aqueous extract: Potential nanoshuttles for brain-delivery of phenolic compounds. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 42, p.233-244, 2018.

MANSUR, A.R., SONG, N.E., JANG, H.W., LIM, T.G., YOO, M., NAM, T.G. Optimizing the ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of flavonoids in common buckwheat sprouts. **Food Chemistry**. 293, 438–445, 2019.

MARTINS, M. A. R.; PINHO, S. P.; COUTINHO, J. A. P. Insights into the Nature of Eutectic and Deep Eutectic Mixtures. **Journal of Solution Chemistry**, p. 1-21, 2018.

MATOS, F. J. A.; LORENZI, H. Plantas Mediciniais no Brasil - **Nativas e Exóticas** - 2ª Edição. - Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008.

McLAUGHLIN, J. L. Paw Paw and Cancer: Annonaceous acetogenins from discovery to commercial products. **Journal of Natural Products**, 71, p. 1311-1321, 2008.

MERZA, F.; FAWZY, A.; ALNASHEF, I.; AL-ZUHAIR, S.; TAHER, H. Effectiveness of using deep eutectic solvents as an alternative to conventional solvents in enzymatic biodiesel production from waste oils. **Energy Reports**, [s.l.], v. 4, p.77-83, 2018.

MOGHADAMTOUSI, S. Z.; FADAEINASAB, M.; NIKZAD, S.; MOHAN, G.; ALI, H. M.; KADIR, H. A. *Annona muricata* (Annonaceae): a review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. **International Journal of Molecular Sciences**, 16, p.15625-15658, 2015.

MORAES, I. V. M. Extração de compostos bioativos da folha da gravioleira (*Annona muricata* L.) e concentração dos extratos por ultra e nanofiltração. 2016. 165 f. **Tese (Doutorado)** - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

MORAIS, P.; GONÇALVES, F.; COUTINHO, J, A, P.; VENTURA, S, P, M. Ecotoxicity of cholinium- based deep eutectic solvents. **Sustainable Chemistry and Engineering**, 2015.

MOSCA, J. L.; CAVALCANTE, C. E. B.; DANTAS, T. M. Características botânicas das principais anonáceas e aspectos fisiológicos de maturação. Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2006.

NETA, M, T, S, L.; JESUS, M, S.; SILVA, J, L, A.; ARAUJO, H, C, S.; SANDES, R, D, D.; SHANMUGAM, S.; NARAIN, N. Effect of spray drying on bioactive and volatile compounds in soursop (*Annona muricata*) fruit pulp. **Food Research International**, 2018.

NOVÁKOVÁ, L.; VLCKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bioanalytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytical Chemical Acta**, v. 656, p. 8-35, 2009.

NÚÑEZ, O.; GALLART-AYALA, H.; MARTINS, C. P. B.; LUCCHI, P. New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. **Journal of Chromatography**. A, v. 1228, p. 298-323, 2012.

OZTURK, B., PARKINSON, C., GONZALEZ-MIQUEL, M. Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents. **Separation and Purification Technology**. 206, 1–13, 2018.

PÉREZ-NAVARRO, J.; IZQUIERDO-CAÑAS, P. M.; MENA-MORALEZ, A.; MARTINEZ-GASCUEÑA, J.; CHÁCON-VOZMEDIANO, J. L.; GÁRCIA-ROMERO, E.; HERMOSIN-GUTIÉRREZ, I.; GÓMEZ-ALONSO, S. Phenolic compounds profile of different berry parts from novel *Vitis vinifera* L. red grape genotypes and Tempranillo using HPLC-DAD-ESI-MS/MS: A varietal differentiation tool. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 295, p.350-360, 2019.

PINTO, N, C, C.; CAMPOS, L, M.; EVANGELISTA, A, C, S.; LEMOS, A, S, O.; SILVA, T, P.; MELO, R, C, N.; LOURENÇO, C, C.; SALVADOR, M, J.; APOLÔNIO, A, C, M.; SCIO, E.; FABRI, R, L. Antimicrobial *Annona muricata* L. (soursop) extract targets the cell membranes of Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 107, p.332-340, 2017.

PISOSCHI, A, M.; POP, A.; GEORGESCU, C.; TURCUS, V.; OLAH, N, K.; MATHE, E. An overview of natural antimicrobials role in food. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 143, p.922-935, 2018.

PROMMUAK, C.; DE-EKNAMKUL, W.; SHOTIPRUK, A. Extraction of flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxidant activity of extracts. **Separation and Purification Technology**, v. 62, n. 2, p. 444–448, 2008.

QI, X.L., PENG, X., HUANG, Y.Y., LI, L., WEI, Z.F., ZU, Y.G., FU, Y.J. Green and efficient extraction of bioactive flavonoids from *Equisetum palustre* L. by deep eutectic solvents-based negative pressure cavitation method combined with macroporous resin enrichment. **Industrial Crops and Products**. v. 70, 142–148, 2015.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, [s.l.], v. 26, p.1231-1237, 1999.

RODUAN, M, R, M.; HAMID, R, A.; CHEAH, Y, K.; MOHTARRUDIN, N. Cytotoxicity, antitumor-promoting and antioxidant activities of *Annona muricata* in vitro. **Journal Of Herbal Medicine**, [s.l.], v. 15, p.100-219, 2019.

RUESGAS-RAMÓN, M; FIGUEROA-ESPINOZA, M, C; DURAND, E. Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 65, n. 18, p.3591-3601, 26 abr. 2017.

RUß, C., KÖNIG, B. Low melting mixtures in organic synthesis - An alternative to ionic liquids? **Green Chemistry**. 14, 2969–2982, 2012.

SACRAMENTO, C. K.; MOURA, J. I. L.; COELHO JÚNIOR, E. Graviola. In: SANTOS-SEREJO, J. A.; DANTAS, J. L. L.; COELHO, Y. S. (Ed.). Fruticultura Tropical: espécies regionais e exóticas. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 203- 237, 2009.

SAFAVI, A.; AHMADI, R.; RAMEZANI, A. M. Vortex-assisted liquid-liquid microextraction based on hydrophobic deep eutectic solvent for determination of malondialdehyde and formaldehyde by HPLC-UV approach. **Microchemical Journal**, [s.l.], v. 143, p.166-174, 2018.

SANTOS, E. R. M. Extração caracterização e avaliação bioativa do extrato de rumex acetosa. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)** – Centro de tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 105 f., 2013.

SANTOS, P. S.; CHO, Y. N.; WOO, H. C.; CHUN, B. S. Green and efficient extraction of polysaccharides from brown seaweed by adding deep eutectic solvent in subcritical water hydrolysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 198, p. 1474-1484, 2018.

SILVA, A, C.M. Compostos bioativos da polpa, casca e folhas da gravioleira sob diferentes métodos de secagem. 2016. 58 f. **Dissertação (Mestrado)** - Curso de Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2016.

SILVA, V.; IGREJAS, G.; FALCO, V.; SANTOS, T, P.; TORRES, C.; OLIVEIRA, A, M, P.; PEREIRA, J, E.; AMARAL, J, S.; POETA, P. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of phenolic compounds extracted from wine industry by-products. **Food Control**, [s.l.], v. 92, p.516-522, 2018.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, S. A. Colorimetric of total phenolics with phosphomolibdicphosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology & Viticulture**, California, US, v. 16, p. 144-158, 1965.

SÃO JOSÉ, A. R., PIRES, M. de M., FREITAS, A. L. G. E., RIBEIRO, D. P., PEREZ, L. A. A. Actuality and perspectives of Annonaceous in the world. **Revista Brasileira Fruticultura**. 36, p. 86-93, 2014.

TUŁEK, A, J.; BENKOVIC, M.; CVITANOVIC, A, B.; VALINGER, D.; JURINA, T.; KLJUSURIC, J, G. Kinetics and thermodynamics of the solid-liquid extraction process of total polyphenols, antioxidants and extraction yield from Asteraceae plants. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 91, p.205-214,2016.

ULTEE, A., BENNIK, M.H.J., MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1561–1568, 2002.

URSO, M. L.; CLARKSON, P.M. Oxidative Stress, Exercise, and Antioxidant Supplementation. **Toxicology**, v. 189, p. 41-54, 2003.

VEILLET, S.; TOMAO, V.; CHEMAT, F. Ultrasound assisted maceration: An original procedure for direct aromatization of olive oil with Brazil. **Food Chemistry**, v. 123, p. 905-911, 2010.

VICENT, H. K.; MORGAN, J. W.; VICENT, K. R. Obesity Exacerbates Oxidative Stress Levels after Acute Exercise. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, p.772-779, 2004.

VIEIRA, V.; PRIETO, M.A.; BARROS, L.; COUTINHO, J.A.P.; FERREIRA, I.C.F.R.; FERREIRA, O. Enhanced extraction of phenolic compounds using choline chloride based deep eutectic solvents from *Juglans regia* L. **Industrial Crops & Products**, p.115, 261–271, 2018.

VILKHU, K.; MAWON, R.; SIMONS, L.; BATES, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 161-169, 2008.

XIE, L.; LIN, Q.; GUO, K.; TONG, C.; SHI, S.; SHI, F. HPLC–DAD–QTOF-MS/MS based comprehensive metabolomic profiling of phenolic compounds in *Kalimeris indica* anti-inflammatory fractions. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 140, p.111-126, 2019.

XIE, Y.; LIU, H.; LIN, L.; ZHAO, M.; ZHANG, L.; ZHANG, Y.; WU, Y. Application of natural deep eutectic solvents to extract ferulic acid from *Ligusticum chuanxiong* Hort with microwave assistance. **RSC Advantages**, 9, 22677–22684, 2019.

XIU-QIN, L.; CHAO, J.; WEI, Y.; YUN, L.; MIN-LI, Y.; XIAO-GANG, C. UPLCPDAD Analysis for Simultaneous Determination of Ten Synthetic Preservatives in Foodstuff. **Chromatographia**, 68, p. 57–63, 2008.

XU, M., RAN, L., CHEN, N., FAN, X., REN, D., YI, L. Polarity-dependent extraction of flavonoids from citrus peel waste using a tailor-made deep eutectic solvent. **Food Chemistry**, 297, 124-970, 2019.

YADAV, A.; TRIVEDI, S.; RAI, R.; PANDEY, S. Densities and dynamic viscosities of (choline chloride + glycerol) deep eutectic solvent and its aqueous mixtures in the temperature range (283.15-363.15) K. **Fluid Phase Equilibria**, 367, 135–142, 2014.

YANG, H., CHEN, L., ZHOU, C., YU, X., YAGOUB, A.E.G.A., MA, H. Improving the extraction of L-phenylalanine by the use of ionic liquids as adjuvants in aqueous biphasic systems. **Food Chemistry**, 245, 346–352, 2018.

YANG, H.; SUN, Y.; CAI, R.; CHEN, Y.; GU, B. The impact of dietary fiber and probiotics in infectious diseases. **Microbial Pathogenesis**, [s.l.], v. 140, p.103-931, 2020.

WANG, R.; LI, W.; CHEN, Z. Solid phase microextraction with poly (deep eutectic solvent) monolithic column online coupled to HPLC for determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 1018, p.111-118, 2018.

WANG, S.; PENG, X.; ZHONG, L.; JING, S.; CAO, X. Choline chloride/urea as na effective plasticizer for production of cellulose films. **Carbohydrate Polymers**, v. 117p. 133-139, 2015.

WANG, T.; JIAO, J.; GAI, Q, Y.; WANG, P.; GUO, N.; NIU, L, L.; FU, Y, J.Enhanced and green extraction polyphenols and furanocoumarins from Fig (*Ficus carica* L.) leaves using deep eutectic solvents. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 145, p.339-345, 2017.

WEI, Z.; QI, X.; LI, T.; LUO, M.; WANG, W.; ZU, Y.; FU, Y. Application of natural deep eutectic solvents for extraction and determination of phenolics in *Cajanus cajan* leaves by ultra performance liquid chromatography. **Separation And Purification Technology**, [s.l.], v. 149, p.237-244, 2015.

WERNER, J. Novel deep eutectic solvent-based ultrasounds-assisted dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of the aqueous phase for HPLC-UV determination of aromatic amines in environmental samples. **Microchemical Journal**, [s.l.], p.104-405, 2019.

ZHANG, L.; WANG, M. Optimization of deep eutectic solvent-based ultrasound assisted extraction of polysaccharides from *Dioscorea opposita* Thunb. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 675-681, 2017.

ZHOU, P.; WANG, X.; LIU, P.; HUANG, J.; WANG, C.; PAN, M.; KUANG, Z. Enhanced phenolic compounds extraction from *Morus alba* L. leaves by deep eutectic solvents combined with ultrasonic-assisted extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 120, p.147-154, 2018.