UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GABRIELA MARQUES BITTENCOURT

Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de araçá (*Psidium grandifolium* Mart. ex DC.) obtidos por líquido pressurizado (PLE) e por fluido supercrítico (SFE)

GABRIELA MARQUES BITTENCOURT

Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de araçá (*Psidium grandifolium* Mart. ex DC.) obtidos por líquido pressurizado (PLE) e por fluido supercrítico (SFE)

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof^a. Dr^a. Alessandra Lopes de Oliveira.

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

BB624a Bittencourt, Gabriela Marques
Avaliação da atividade antioxidante e
antimicrobiana de extratos de araçá (*Psidium
grandifolium* Mart. ex DC.) obtidos por líquido
pressurizado (PLE) e / Gabriela Marques Bittencourt
; orientadora Alessandra Lopes de Oliveira. --
Pirassununga, 2018.
116 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade
de São Paulo.

1. *Psidium cinereum*. 2. dióxido de carbono
supercrítico. 3. extração com etanol pressurizado. 4.
caracterização de voláteis. 5. composição mineral. I.
Oliveira, Alessandra Lopes de, orient. II. Título.

*Dedico este trabalho à minha família
que sempre me apoiou e meu deu forças
em todos os momentos, mesmo que
inconscientemente. Amo vocês.*

*"A verdadeira alegria vem da harmonia profunda entre as pessoas,
que todos experimentam no seu coração e que nos faz sentir a beleza de estar juntos,
de apoiar-se mutuamente no caminho da vida "*

Papa Francisco

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, pela família que ele me deu e por todas as graças recebidas diariamente.

Agradeço a meus pais (Silvia e João Cesar) por todos os ensinamentos, por todo o esforço que nunca pouparam para sempre dar o melhor para mim e para minha irmã e, principalmente, por estarem sempre presentes.

Agradeço à minha irmã (Isabela) por toda ajuda com a correção de minhas infinitas traduções, ajuda na parte de botânica de meu trabalho e por ser minha cabeleireira (rs).

Agradeço aos meus sogros (Janete e Dito) por todo apoio e por terem confiado a mim um dos seus três bens mais preciosos, seu filho Felipe.

Agradeço ao meu marido (Felipe) por todo amor, carinho, dedicação, compreensão, suporte, por me aguentar e me amar mesmo nos meus piores dias, pelas palavras sábias e pelo exemplo. Saiba que me espelho muito em você. Você com toda certeza é o melhor marido do mundo.

Agradeço, imensamente, à minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Lopes de Oliveira por todo ensinamento, por nunca poupar esforços para me ajudar, pela paciência comigo e por toda confiança que sempre deposita sobre mim me fazendo confiar que sou capaz.

Agradeço à família de coração que criei em Pirassununga: minha amiga Eliane (Moti) que sempre esta comigo desde a época em que éramos estagiárias no LTAPPN, as meninas da Acasalar que me receberam de braços abertos e que tanto me fazem rir alegrando meus dias na cidade, os companheiros pós-graduandos do laboratório Naila, Heber e Victor por todas as conversas e ajudas tanto científicas quanto pessoais, a querida Samira, as estagiárias Paula, Lia, Marina, Gabriela, Marcela, Suzana, Yara e claro, minhas estagiárias e amigas Daniele (Afobada) e Raphaela que tanto me ajudaram.

Agradeço ao querido Nilson que está sempre disposto a ajudar a todos da melhor forma possível.

Agradeço a todos os professores e funcionários do ZEA que me ajudaram ao longo de todos estes anos (já se foram 8), em especial à Prof^ª. Dr^ª. Eliana Setsuko Kamimura por toda ajuda na parte estatística e conversas nas nossas noites de trabalho no ZEA.

Agradeço também à CAPES pela concessão da bolsa de estudos e à FAPESP pelo financiamento do projeto.

A todos vocês, meu muito obrigada, sem vocês eu não teria conseguido. Levarei para sempre um pedacinho de vocês em meu coração.

Poema do amigo aprendiz

"Quero ser o teu amigo. Nem demais e nem de menos.

Nem tão longe e nem tão perto.

Na medida mais precisa que eu puder.

Mas amar-te sem medida e ficar na tua vida,

Da maneira mais discreta que eu souber.

Sem tirar-te a liberdade, sem jamais te sufocar.

Sem forçar tua vontade.

Sem falar, quando for hora de calar.

E sem calar, quando for hora de falar.

Nem ausente, nem presente por demais.

Simplesmente, calmamente, ser-te paz.

É bonito ser amigo, mas confesso é tão difícil aprender!

E por isso eu te suplico paciência.

Vou encher este teu rosto de lembranças,

Dá-me tempo, de acertar nossas distâncias..."

Padre Zezinho

*“Devemos ser grato a Deus pelos pequenos detalhes. Nos detalhes descobrimos o valor de uma realidade.
Olhar as miudezas da vida faz a diferença.”*

Pe. Fábio de Melo

*“Você é quem decide o que vai ser eterno em você, no seu coração. Deus nos dá o dom de eternizar em nós
o que vale a pena, e esquecer definitivamente aquilo que não vale...”*

Pe. Fábio de Melo

RESUMO

BITTENCOURT, G. M. **Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de araçá (*Psidium Grandifolium* Mart. Ex DC.) obtidos por líquido pressurizado (PLE) e por fluido supercrítico (SFE).** 2018. 116 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

O araçá é um fruto, pertencente à espécie *Psidium grandifolium* Mart. ex DC, nativo da mata atlântica brasileira pouco caracterizado pela literatura científica. Esta pesquisa visou estudar o rendimento de extração e avaliar as atividades antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial de araçá obtido por extração com dióxido de carbono supercrítico (SFE) e dos diferentes extratos obtidos por extração com etanol pressurizado (PLE) seguindo um delineamento composto central rotacional com temperatura e tempo estático como variáveis independentes estudadas. Avaliou-se também o perfil de voláteis do óleo essencial, o teor de compostos fenólicos totais dos extratos etanólicos e as alterações causadas na matriz vegetal por diferentes processos de extração. Com a SFE conseguiu-se extrair toda a fração lipídica do fruto ($2,33\% \pm 0,04.10^{-2}\%$), a análise dos compostos voláteis do óleo essencial obtido permitiu inferir que este possui diversos compostos com potencial bioativo tais como E-cariofileno (17.56%), α -humuleno (16,26%) e β -sesquifelandreno (14.27%); porém este óleo essencial não apresentou atividade antioxidante relevante. O extrato etanólico com maior rendimento (17, 49%) foi obtido a 74 °C por 6 min, mesma condição em que obteve-se a maior atividade antioxidante ($EC_{50} = 6,37$ mg/mL), porém o maior teor de compostos fenólicos totais (136,95 mg EGA/100 g de massa seca) foi obtido quando aplicou-se 60°C por 9 min. Em relação à atividade antimicrobiana, tanto os extratos obtidos por PLE quanto por SFE apresentaram atividade contra cepas de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *B. cereus*, somente extratos etanólicos apresentaram atividade contra cepas de *L. monocytogenes* e nenhum dos extratos apresentaram atividade contra cepas de *B. subtilis*, *E. coli* e *Salmonella*. Em ambos os extratos foi possível identificar compostos com potencial aplicação farmacológica. O estudo de processos de extração que envolvam inovação tecnológica na obtenção extratos com atividade biológica visa contribuir com o extrativismo consciente ou estimular o plantio em maior escala de mais um fruto tropical empregado na medicina popular brasileira.

Palavras-Chave: *Psidium cinereum*, CO₂ supercrítico, extração com etanol pressurizado, caracterização de voláteis, atividades antioxidante e antimicrobiana, composição mineral.

ABSTRACT

BITTENCOURT, G. M. **Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activity of araçá extracts (*Psidium Grandifolium* Mart. Ex DC.) obtained by pressurized liquid extraction (PLE) and supercritical fluid extraction (SFE).** 2018. 116 p. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

The araçá is a fruit, belonging to the species *Psidium grandifolium* Mart. ex DC, native of the Brazilian Atlantic Forest, is not largely characterized by the scientific literature. This research work aimed to study the extraction yield and to evaluate the antioxidant and antimicrobial activities of the araçá essential oil obtained by supercritical carbon dioxide extraction (SFE) and the different extracts obtained by pressurized ethanol extraction (PLE) following a central composite design with temperature and static time as independent variables studied. It was also evaluated the volatile profile of the essential oil, the content of total phenolic compounds of the ethanolic extracts and the changes caused in the vegetal matrix by different extraction processes. SFE was able to extract the whole lipid fraction of the fruit ($2.33\% \pm 0.04.10^{-2}\%$), the analysis of the volatile compounds of the essential oil obtained allowed to infer that it has several compounds with bioactive potential such as E- caryophyllene (17.56%), α -humulene (16.26%) and β -sesquipelandene (14.27%); but this essential oil had no relevant antioxidant activity. The highest ethanolic extract (17, 49%) was obtained at 74 °C for 6 min, the same condition in which the highest antioxidant activity was obtained ($EC_{50} = 6.37$ mg/mL), but the higher content of total phenolics content (136.95 mg EGA / 100 g dry mass) was obtained when 60 °C was applied for 9 min. In relation to the antimicrobial activity, both extracts obtained by PLE and SFE showed activity against *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *B. cereus* strains, only ethanolic extracts showed activity against *L. monocytogenes* strains and none of the extracts presented activity against *B. subtilis*, *E. coli* and *Salmonella* strains. In both extracts it was possible to identify compounds with potential pharmacological application. The study of extraction processes that involve technological innovation in obtaining extracts with biological activity aims to contribute to the conscious extraction or stimulate the larger scale cultivation of another tropical fruit used in Brazilian popular medicine.

Keywords: *Psidium cinereum*, supercritical CO₂, pressurized ethanol extraction, volatile characterization, antioxidant and antimicrobial activities, mineral composition.

Lista de Figuras

Figura 1 - Diagrama de fases para o dióxido de carbono (CO ₂).....	37
Figura 2 - Esquema do extrator SFE utilizado neste trabalho.	51
Figura 3 - Esquema do extrator ASE (PLE) utilizado neste trabalho.....	53
Figura 4 - Amostra aderida à fita de carbono (A), Microscópio Eletrônico de Varredura TM 3000 aberto com a amostra na câmara de leitura (B), Microscópio Eletrônico de Varredura TM 3000 em operação, sob vácuo (C).	55
Figura 5 - Refratômetro usado para medir o índice de refração a 20°C de extrato SFE de araçá	59
Figura 6 - Araçá <i>in natura</i> (a), seco (b) e triturado (c).....	65
Figura 7 - Análise do tamanho de partículas da amostra por difração a laser.....	67
Figura 8 - Diagrama de Pareto das variáveis T (x ₁) e ST (x ₂) e a interação T × ST (x ₁ .x ₂) no rendimento dos extratos de araçá.....	70
Figura 9 - Diagrama de valores experimentais <i>versus</i> valores preditos pelo modelo de primeira ordem para rendimento de extração.....	72
Figura 10 - Diagrama de valores experimentais <i>versus</i> valores preditos pelo modelo de segunda ordem para rendimento de extração.	72
Figura 11 - Superfície de resposta gerada pelo modelo de segunda ordem que descreve os efeitos das variáveis independentes no rendimento da extração.	73
Figura 12 – Micrografia Eletrônica de Varredura da matéria-prima.....	74
Figura 13 – Micrografia Eletrônica de Varredura da amostra pós SFE.	75
Figura 14 – Micrografia Eletrônica de Varredura da amostra pós PLE de maior rendimento do DCCR.	76
Figura 15 – Micrografia Eletrônica de Varredura da amostra pós PLE de menor rendimento do DCCR.	76
Figura 16 – Micrografia Eletrônica de Varredura da amostra pós PLE com etanol isopropílico nas condições de maior rendimento do DCCR.....	77
Figura 17 – Micrografia Eletrônica de Varredura da amostra pós Soxhlet com etanol absoluto.	78
Figura 18 – Micrografia Eletrônica de Varredura da amostra pós Soxhlet com éter etílico.	78

Figura 19 - Espectro gerado pelo EDS da matéria-prima	79
Figura 20 - Cinética de redução do radical DPPH• por efeito dos extratos de araçá. A) ensaio 1; B) 2; C) 3; D) 4; E) 5; F) 6; G) 7; H) 8; I) ponto central do DCCR; J) óleo essencial da SFE.....	83
Figura 21 - Diagrama de Pareto da influência das variáveis T (x_1) e St (x_2) e da interação TxSt ($x_1.x_2$) sobre a atividade antioxidante de extratos de araçá.....	84
Figura 22 - Ensaio de disco de difusão para determinação qualitativa da atividade antimicrobiana de extratos de araçá contra cepas de A) <i>P. aeruginosa</i> , B) <i>B. subtilis</i> , C) <i>E. coli</i> e D) <i>S. aureus</i>	87
Figura 23 - Ensaio de disco de difusão para determinação qualitativa da atividade antimicrobiana de extratos de araçá contra cepas de A) <i>B. cereus</i> , B) <i>L. monocytogenes</i> e C) <i>Salmonella spp.</i>	88
Figura 24 - Cromatograma total de íons para os compostos voláteis do óleo essencial de araçá e dos compostos voláteis capturados pela coluna de Porapak-Q®	90
Figura 25 - Curva-padrão para o ácido gálico.....	93
Figura 26 - Diagrama de Pareto da influência das variáveis T (x_1) e St (x_2) e da interação TxSt ($x_1.x_2$) sobre o teor de compostos fenólicos.....	95
Figura 27 - Diagrama de valores experimentais versus valores preditos pelo modelo de primeira ordem para TCF.....	96
Figura 28 - Diagrama de valores experimentais versus valores preditos pelo modelo de segunda ordem para TCF	96
Figura 29 - Superfície de resposta gerada pelo modelo de primeira ordem que descreve os efeitos das variáveis independentes no TCF.	97

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Caracterização e Composição centesimal de Polpa de Araçá	27
Tabela 2 - Valores reais dos níveis das variáveis utilizadas no delineamento composto central rotacional (DCCR) para dois fatores.	53
Tabela 3 - Planejamento experimental completo não aleatorizado para otimização de extração de extrato de Araçá em etanol pressurizado.	54
Tabela 4 - Diluição e conteúdo dos tubos de ensaio para determinação da concentração inibitória mínima.	58
Tabela 5 - Composição centesimal.	65
Tabela 6 - Massa de amostra retida nas peneiras padrão Tyler utilizadas no cálculo do diâmetro médio de partículas.	66
Tabela 7 - Massas para a determinação da densidade aparente.	68
Tabela 8 - Extração com CO ₂ supercrítico à 200 bar e 50 °C por 6 horas.	69
Tabela 9 - Extração com etanol absoluto pressurizado seguindo DCCR proposto.	70
Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) para o rendimento no planejamento experimental (Erro residual).	71
Tabela 11 - Concentração eficiente para atividade antioxidante dos extratos etanólicos de araçá e equação das linhas de tendência utilizadas nos cálculos.	82
Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) para os modelos de primeira e segunda ordem para EC ₅₀ dos extratos etanólicos de araçá (Erro residual).	84
Tabela 13 - Dados referentes à atividade antimicrobiana qualitativa de extratos de araçá.	86
Tabela 14 - Perfil de voláteis de araçá.	92
Tabela 15 - Teor de compostos fenólicos (TCF) nos extratos etanólicos de araçá.	94
Tabela 16 - Análise de variância (ANOVA) para os modelos de primeira e segunda ordem para TCF dos extratos etanólicos de araçá (Erro residual).	95

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	19
2.	Revisão Bibliográfica	23
2.1	Araçá	25
2.2	Extratos vegetais.....	30
2.3	Extração com Fluido Supercrítico (SFE)	34
2.4	Extração com Líquido Pressurizado (PLE)	39
3.	Objetivos	43
3.1	Objetivos gerais	45
3.2	Objetivos específicos	45
4.	Material e métodos.....	47
4.1	Preparo de amostra.....	49
4.2	Caracterização da amostra.....	49
4.3	Obtenção do óleo essencial por meio de extração com CO₂ supercrítico....	50
4.4	Extração com etanol pressurizado.....	52
4.5	Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva.....	54
4.6	Avaliação da Atividade Antioxidante.....	55
4.7	Avaliação da Atividade Antimicrobiana.....	56
4.7.1	Método de disco de difusão.....	56
4.7.2	Concentração mínima inibitória	57
4.8	Caracterização dos extratos	58
4.8.1	Índice de refração	58
4.8.2	Análise do perfil de voláteis em cromatografo gasoso acoplado a espectrofotômetro de massas (CG/EM)	59
4.8.3	Compostos fenólicos totais (reativos com Folin-Ciocalteu)	60
4.9	Análise estatística	60

5.	Resultados e discussão.....	63
5.1	Caracterização da amostra	65
5.1.1	Composição centesimal	65
5.1.2	Granulometria	66
5.1.3	Porosidade de leito.....	67
5.2	Rendimento global de extração	68
5.2.1	Extração com Fluido Supercrítico (SFE).....	68
5.2.2	Extração com líquido pressurizado (PLE).....	69
5.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	74
5.4	Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).....	79
5.5	Atividade Antioxidante	80
5.6	Atividade antimicrobiana	85
5.6.1	Disco de difusão	85
5.6.2	Concentração mínima inibitória	88
5.7	Índice de Refração	89
5.8	Perfil de voláteis	89
5.9	Compostos fenólicos.....	93
6.	Conclusão	99
	Referências	103

Lista de Siglas e Abreviaturas

ANOVA – análise de variância

ASE – extração com uso de solventes acelerada

ASR – análise da superfície de resposta

ATCC – coleção de tipo de cultura americana

CMI – concentração mínima inibitória

CO₂ – dióxido de carbono

DCCR – delineamento composto central rotacional

DPPH• – 2,2-Diphenyl-picrilhidrazil

EC₅₀ – concentração eficiente

EDS – espectroscopia de energia dispersiva

EGA – equivalente em ácido gálico

GC-MS – cromatografia gasoso acoplada a espectrofotômetro de massas

GRAS – geralmente reconhecido como seguro à saúde

HISA – herbário de Ilha Solteira

MEV – microscopia eletrônica de varredura

PLE – extração com líquido pressurizado

R² – coeficiente de refressão

SFE – extração com fluido supercrítico

St – tempo estático

T – temperatura

TCF – teor de compostos fenólicos

TIC – cromatograma total de íons

UFC – unidade formadora de colônia

1. Introdução

O Brasil possui o mais rico bioma vegetal do planeta, com milhares de espécies de plantas distribuídas nos cinco principais biomas: Mata atlântica, Cerrado, Amazônia, Pantanal e Pampa (FIASCHI, PIRANI, 2009; SOUZA et al., 2008). Com isto, existe uma grande variedade de frutas exóticas pouco estudadas e que podem atrair interesse de consumidores e indústrias, tanto na área farmacêutica como na área alimentícia. Uma destas frutas é o *Psidium cattleianum*, pertencente à família Myrtaceae, nativa da Mata Atlântica brasileira e popularmente conhecida como Araçá (ALVARENGA, et al., 2013).

O Araçazeiro é um arbusto que produz frutos, em geral, com menos de 20 g (ALVARENGA, et al., 2013) que quando em condições silvestres, possui grande desenvolvimento em solos úmidos e não depende muito do clima, sendo resistente à geadas (SILVA, TASSARA, 1998). Os frutos do Araçazeiro amadurecem, no Brasil, entre os meses de fevereiro e maio (DREHMER, AMARANTE, 2008); possuem casca vermelha, verde ou amarela, dependendo da espécie, polpa branca mucilaginosa, aromática e com grande quantidade de sementes (HAMINIUK et al., 2006). O araçá apresenta gosto ácido, é rico em vitamina C e em compostos fenólicos, tais como epicatequina e ácido gálico (MEDINA et al., 2011). O sabor do fruto é o resultado da interação de diversos odores e é dominado pela presença de numerosos aldeídos e cetonas (EGEA et al., 2014). As poucas pesquisas realizadas envolvendo estes frutos sugerem grande potencial nutricional e funcional (GALHO et al., 2007).

De acordo com Denardin et al. (2015) o araçá é utilizado na medicina popular, no tratamento de diarreias, hemorragias e câibras. No entanto, apesar de ser tradicionalmente apreciado por seus atributos sensoriais e pela expectativa de suas propriedades funcionais, o Araçá é ainda pobremente caracterizado e a informação científica disponível sobre esta fruta é limitada (CASTRO, 2015).

Ao se investigar a composição destas matérias-primas conhecidas popularmente, mas não cientificamente, logo se pensa nos benefícios das dietas ricas em compostos bioativos. Dietas ricas em compostos fenólicos, por exemplo, estão associadas com a diminuição dos riscos de doenças cardiovasculares, câncer e outras condições associadas à idade (DENARDIN et al., 2015). Há uma grande demanda por antioxidantes naturais para aplicações biofarmacêuticas em diferentes áreas de estudo. De fato, pesquisas intensas têm sido realizadas buscando extração, caracterização e utilização de antioxidantes naturais, tais como óleo essencial e extratos de plantas que são potenciais candidatos no combate à patologias relacionadas à oxidação (OZEN, DEMIRTAS, AKSIT, 2011). No entanto, ainda

há poucos estudos de identificação de compostos fitoquímicos e atividades antioxidantes de extratos de frutas nativas brasileiras (DENARDIN et al., 2015).

O Araçá é fonte de antioxidantes naturais, antimicrobianos e de agentes antiproliferativos (EGEA et al., 2014) se mostrando assim, um objeto de estudo interessante. Estudos mostram que extratos de araçá potencialmente reduzem metástase de células cancerígenas no pulmão (IM et al., 2012; JUN et al., 2011), apresentam atividade antimicrobiana (BRIGHENTI et al., 2008; SOUZA et al., 2004) além de exercerem efeitos anti-cáries, efeito testado em roedores (MENEZES, 2010), podendo assim, ser utilizado por diversas áreas do conhecimento.

Extratos de folha de araçá estão relacionados à atividade analgésica periférica, apresentam atividade antioxidante, teores de flavonoides, saponinas, glicosídeos, antraquinas e taninos (ALVARENGA, et al., 2013).

No Brasil não há plantações objetivando comércio em larga escala e nem aplicações industriais, fazendo com que esta fruta ainda possua um caráter silvestre, sendo consumida principalmente *in natura* e não na forma produtos manufaturados (HAMINIUK et al., 2006), porém o araçá possui grande potencial de aplicação em indústrias farmacêuticas e alimentícias, que este estudo pretende mostrar.

O estudo de processos inovadores de extração na obtenção de extratos ricos em princípios ativos servirá como um estímulo ao cultivo controlado de mais um importante fruto da Mata Atlântica brasileira.

A matéria-prima utilizada neste projeto é o araçá da espécie *Psidium grandifolium* Mart. ex DC. cultivada no município de Pirassununga, localizado na região Centro-Leste do estado de São Paulo a uma latitude 21°59'46" Sul e a uma longitude 47°25'36" Oeste, estando a uma altitude de 625 metros (CIDADE-BRASIL, 2012), gentilmente doada pelo Prof. Dr. Rogério Lacaz-Ruiz.

Não foram encontradas referências na bibliografia que caracterizem extratos da espécie *Psidium grandifolium* Mart. ex DC., porém como esta espécie já foi conhecida como *Psidium cinereum* Mart., encontrou-se um artigo que caracterizou a atividade e o teor de compostos fenólicos em infusões da folha desta espécie. Esta falta de estudos científicos envolvendo extratos desta planta evidencia a relevância deste trabalho.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Araçá

O Brasil destaca-se como uma potencial fonte de produtos naturais por ter a maior biodiversidade de plantas do planeta e também devido ao fato de a maioria das plantas brasileiras serem inexploradas em relação ao potencial farmacológico (PINTO et al., 2002).

A mata atlântica é um grande bioma brasileiro presente em 17 estados do país mas que atualmente ocupa somente 4% de seu território original (RBMA, 2018). *Psidium cattleianum* Sabine é um fruto arredondado com aproximadamente 3 cm de diâmetro, pertencente à família *Myrtaceae* e originário deste bioma (SILVA et al., 2014).

A família *Myrtaceae* consiste em pelo menos 130 gêneros e 3.800 espécies distribuídas ao redor do mundo incluindo muitos frutos que são usados devido às suas propriedades medicinais e importância como fonte alimentar (WILSON et al., 2001; LUCAS et al., 2005; AGRA et al., 2008). Membros desta família incluem os gêneros *Eugenia*, *Myrcianthes*, *Campomanesia* e *Psidium* (MARIN et al., 2008).

O gênero *Psidium* possui cerca de 100 espécies que podem ser encontradas ao longo dos trópicos e subtropicais da América e da Austrália. No Brasil, pode ser encontrado ao longo de todo o território, da região da Amazônia ao estado do Rio Grande do Sul (LANDRUM, 2003; PINO, 2004).

Este fruto é comumente conhecido como strawberry guava, Chinese guava, cattley guava, Jeju guava, cherry guava, purple guava, waiawi, guayaba ou araçá (PATEL, 2012).

O araçazeiro é uma árvore de porte médio, há referências que reportam que o arbusto pode ter entre 1 e 4 m de altura porém outras referências relatam este pode atingir até 10m de altura. Há relatos de que, no clima tropical, o araçazeiro atinge alturas maiores do que em temperatura média mais amena e que variação amarela do araçá cresce a alturas pouco menores que as demais espécies, mesmo quando submetidas às mesmas condições. Esta planta cresce em ambiente úmido e luminoso, floresce de junho a dezembro e o fruto amadurece entre setembro e março (BIEGELMEYER et al., 2011; MARIN et al., 2008). As folhas são verdes, lustrosas e resistentes (PATEL, 2012). Atualmente esta planta é cultivada em diferentes países, pois se adapta facilmente a diferentes climas (BIEGELMEYER et al., 2011; MARIN et al., 2008). No Hawaii, a planta é atualmente considerada como erva daninha, pois tem capacidade de propagar facilmente pela semente (PINO, MARBOT e VÁZQUEZ, 2001).

Os frutos são abundantes, possuem tamanho pequeno e polpa translúcida. O fruto maduro pode ser consumido *in natura* ou usado para fazer suco, sorvete e sobremesas. Esta fruta é muito perecível e uma vez colhida mantém suas características sensoriais apenas por 3 ou 4 dias em temperatura ambiente (PATEL, 2012). A polpa do araçá é succulenta e rica em vitamina C, possuindo esta vitamina em concentrações de 3 a 4 vezes maior do que a de frutas cítricas (RASEIRA e RASEIRA, 1996).

Psidium cattleianum Sabine (*strawberry guava*) é frequentemente descrita como sendo mais aromática do que a espécie *Psidium guajava* (*common guava*) (MCCOOK-RUSSELL, 2012).

O araçá não tem sido extensivamente estudado, porém alguns estudos quantificam seus compostos voláteis, capacidade antioxidante, polifenóis e conteúdo nutricional (PINO, MARBOT e VÁZQUEZ, 2001).

Silva et al. (2014) e Mccook-Russel et al. (2012) analisaram a composição centesimal de polpa de araçá, conforme apresentado na Tabela 1. Silva et al. (2014) destacou o alto teor de fibras dos frutos de *Psidium cattleianum* Sabine, pois, segundo os autores, o consumo de porções de 100 g de polpa fresca fornece aproximadamente 20 % da ingestão diária recomendada de fibras, baseado em uma dieta de 2.000 kcal; os mesmos autores identificaram também 9 carotenóides utilizando espectrofotometro de massa, sendo o all-trans- β -criptoxantina o carotenoide majoritário correspondendo a 34 % do total, seguido do trans- β -caroteno e all-trans-luteína, que correspondem a 26 % e 20 %, respectivamente. Pereira et al. (2012) identificou luteína como o carotenoide majoritário no araçá utilizando HPLC-DAD. No entanto o araçá não é uma boa fonte de carotenoides.

Silva et al (2014) determinou também o perfil de compostos fenólicos em araçá utilizando HPLC-DAD-ESI-MS/MS identificando os compostos ácido gálico, hexosídeo de monogalloyol, hexosídeo de dihexa-hidroxidifenool (diHHDP-hexoside), HHDP-digalloyol-hexosídeo, hexosídeo de quercetina, hexosídeo de taxifolina, hexosídeo de eriodictiol hexoside e ácido elágico. Sendo o ácido gálico o composto fenólico majoritário ($12,24 \pm 0,9$ mg EGA/100 g de massa fresca) seguido do hexosídeo de taxifolina ($11,73 \pm 0,8$ mg EGA/100 g de massa fresca) sendo total de compostos fenólicos na amostra expresso em $103,10 \pm 6,5$ mg EGA/100 g de massa fresca de araçá. Gordon et al (2011) reportou valor de $754,4 \pm 12,5$ mg EGA/100 g massa seca de araçá. Mccook-Russel et al. (2012) reportou 4.439 mg EGA/100 g massa fresca de araçá.

Mccook-Russel et al. (2012) também estudou inibição da enzima cyclooxygenase (isômero COX-2) que catalisa a oxidação do ácido aracdônico em prostaglandinas e

tromboxano. Extratos obtidos com hexano e acetato de etila na concentração de 250 µg/mL apresentaram atividade anti COX-2 de 18,3% e 26,5%, respectivamente. O extrato em acetato de etila apresentou ação semelhante à aspirina.

A Tabela 1 apresenta a caracterização e composição centesimal de polpa de araçá de acordo com Silva et al. (2014) e Mccook-Russel et al. (2012).

Tabela 1 - Caracterização e Composição centesimal de Polpa de Araçá

Análise	Silva et al., 2014	Mccook-Russell et al., 2012
pH	4,3 ± 0,1	-
Sólidos solúveis (°Brix)	9,8 ± 0,1	-
Umidade (g/100g)	85,5 ± 3,2	-
Proteínas (g/100g)	6,9 ± 0,1	2,10 ± 0,03
Lipídeos (g/100g)	1,4 ± 0,2	1,24 ± 0,01
Carboidratos (g/100g)	55,1 ± 3,4	-
Fibras (g/100g)	31,0 ± 0,7	324,9 ± 1,7
Cinzas (g/100g)	5,5 ± 0,2	3,05 ± 0,01
Valor energético (kcal/100g)	260,7 ± 15,8	-
Cálcio	-	63,2 ± 0,7
Vitamina C (µg/g de massa fresca)	-	2091 ± 42
Polifenólicos totais/ µg EGA (µg Ac. Gálico/g massa fresca)	-	4439 ± 159
TEAC/ µg TE (µmol de Trolox/g de massa fresca)	-	11,3 ± 0,1

Fonte: SILVA, N. A. et al. Phenolic compounds and carotenoids from four fruits native from the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 22, p. 5072-5084, 2014; MCCOOK-RUSSELL, K. P. et al. Nutritional and nutraceutical comparison of Jamaican *Psidium cattleianum* (strawberry guava) and *Psidium guajava* (common guava) fruits. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 1069-1073, 2012.

Comparando o *Psidium cattleianum* com *P. guajava*, Mccook-Russel et al. (2012) concluíram que *Psidium cattleianum* é uma fonte melhor de nutrientes pois possui maior atividade antioxidante e antimicrobiana, maior teor de vitamina C, o dobro do teor de compostos fenólicos porém apresenta menor atividade anti-inflamatória.

Os estudos realizados por Scur et al (2016) para caracterização do perfil fitoquímico extratos etanólico e aquoso de *P. cattleianum* revelou a presença das mesmas classes de metabólitos em ambos os extratos, foram encontrados taninos, flavonoides e triterpenoides. Ressalta-se a importância do fruto conter flavonoides pois este composto é empregado como agente antitumoral, antiviral, anti-hemorragico, hormonal, anti-inflamatório, antimicrobiano e antioxidante (SIMÕES et al, 2005).

Scur et al. (2016) identificaram 49 compostos voláteis utilizando GC-MS, sendo que a maior classe de compostos voláteis identificada no óleo essencial de *Psidium cattleianum* pertence aos hidrocarbonetos terpenicos representados majoritariamente por α -copaeno, seguido de eucalyptol, α -cadieno e δ -selinene. Marques et al. (2008) também utilizando GC-MS identificou o eucalyptol como componente majoritário do óleo essencial do fruto coletado na Mata Atlântica do Sul do Brasil. Pino et al. (2004) analisaram a composição fitoquímica do fruto colhido em Cuba e identificou 18 compostos sendo epi- α -muurolol o composto majoritário, seguido por α -cadinol, epi- α -cadinol e cariofileno.

O α -copaeno é um sesquiterpeno não oxigenado ao qual atribui-se ações antimicrobiana, anti-inflamatória e cicatrizante (BRITO et al, 2005). Eucalyptol é um monoterpeno de baixa toxicidade para humanos utilizado na aromaterapia (TRIPATHI, 2001) e que apresenta propriedades antimicrobianas, antioxidantes (LEE e SHIBAMOTO, 2001) e bioinseticidas (SUKONTASON et al. 2004).

Quando artigos científicos são comparados, as diferenças entre a composição fitoquímica e as concentrações encontradas por diversos autores podem ser resultado de diversos fatores, tais como variação genética intraespecífica, aspectos do meio ambiente, época de colheita, condições de desenvolvimento, tipo de sólo e parte da planta analisada (ALVES et al., 2008).

Medina et al (2011) estudou os constituintes químicos funcionais de extrato aquoso e de extrato acetônico, reportando que a fruta apresenta altos níveis de compostos fenólicos, acima de 768 mg/100 g de massa fresca. Patel (2012) reportou carotenos, ácido ascórbico e antocianinas como constituintes minoritários.

Vriesmann et al. (2009) estudou a composição de monossacarídeos do mesocarpo de araçá e identificou ácido urônico, galactose, arabinose, glucose, manose, methyl fucose e xylose foram encontrados como monossacarídeos majoritários.

Plantas naturalmente produzem metabólitos secundários que podem ser usados como antimicrobianos. Segundo Brighenti et al. (2008) todos os compostos com atividade antibacteriana conhecida presentes em *P. cattleianum* são fenólicos.

Mccook-Russel et al. (2012) reportou que o extrato metanólico de araçá possui atividade antimicrobiana intermediária contra *B. subtilis* e *S. aureus* e que os extratos obtidos com o uso de hexano e com o uso de acetato de etila como solvente não apresentaram atividade contra as bactérias testadas. Apel et al. (2006) estudou óleo essencial de folhas de araçá e obteve atividade inibição para *S. Aureus* e *P. aeruginosa*. Scur et al. (2016) estudou a atividade antimicrobiana de óleo essencial e de extratos aquoso e etanólico de *Psidium*

cattleianum e constataram que o extrato etanólico apresentou o maior efeito antimicrobiano em relação ao extrato aquoso contra cepas de *S. Enteridis*, *K. pneumonia*, *E. coli*, *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *C. albicans* e efeito semelhante contra cepas de *P. Aeruginosa*, *P. mirabilis* e *B. subtilis*, além disso, a concentração mínima inibitória e a concentração mínima bactericida do óleo essencial para os mesmos microrganismos, obtendo valor de 200 mg / mL para ambas as concentrações mínimas para todos os microorganismos testados (SCUR, 2016). Brighenti et al. (2008) mostrou que o extrato de *P. cattleianum* tem um efeito antibacteriano contra cepas de *S. mutans*, podendo ser usado como fitoterápico para prevenção de cáries dentárias.

Especula-se que combinação de tanino e flavonoides presentes no *P. cattleianum* seja responsável pela inibição e morte de bactérias, e também pela inibição da expressão e da atividade de certas enzimas (BRIGHENTI et al., 2008), pois flavonóides agem nas células bacterianas através da formação de complexos com as proteínas da parede celular causando ruptura das mesmas (TAGURI, TANAKA e KUONO, 2004) e os taninos agem nos microorganismos prevenindo o crescimento dos mesmos pela inibição do transporte de nutrientes e por formar complexos com a parede celular do microorganismo (MCSWEENEY et al., 2001).

Plantas ricas em tanino são conhecidas por suas propriedades anti-hemorrágica, cicatrizante e anti-inflamatória, além de serem usadas no tratamento de diarreia, hipertensão, reumatismo, gastrite, úlcera e distúrbio renal (DUFRESNE e FARNWORTH, 2001). Triterpenóides são conhecidos pela ação anti-hiperalgésica, anti-inflamatória e antimicrobiana (TEPE et al., 2004).

Extrato das folhas de araçá é utilizado, na medicina popular, no tratamento de diarreia e diabetes em alguns países orientais (PATEL, 2012). Plantas de *Psidium* spp. em geral, são usadas tradicionalmente para tratar escorbuto na Ásia e na África, para tratar tosse e problemas pulmonares na Bolívia e no Egito, como um anti-inflamatório e agente hemostático na China e como antidiarreico no México (LOZOYA et al., 1994; JAIARJ et al., 1999).

Estudos demostram que extrato da folha de *Psidium* spp. possui ação contra a atividade microbiana contra a bactéria causadora de diarreia (GNAN e DEMELLO, 1999; TONA et al., 1999, ARIMA e DANNO, 2002, VORAVUTHIKUNCHAI et al., 2004). De acordo com Gutiérrez, Mitchell e Solis (2008), as frutas e folhas de araçá possuem atividade antioxidante, hepatoproteica, antialérgica, antimicrobiana, antigenotóxico, antiplasmoidal,

antiespasmódico, cardioativo, anti-tosse, antidiabético, anti-inflamatório e anticâncer. Moon et al. (2011) também reporta uma possível atividade anticâncer do fruto.

Devido à todas as propriedades inerentes à este fruto, extrato da folha de *Psidium cattleianum* tem sido administrado em terapias para pacientes com câncer, infecções patogênicas e inflamação em modelos experimentais (IM et al., 2012).

2.2 Extratos vegetais

Desde o começo da humanidade, as pessoas usam plantas para propósitos nutricionais, medicinais e religiosos (SILVA, BARREIRA e OLIVEIRA, 2016). Uma pesquisa publicada pela World Health Organization (WHO) em 2003 reporta que 5,6 bilhões de pessoas, aproximadamente 80% da população mundial, utiliza produtos naturais nos primeiros cuidados com a saúde. E este número tende a aumentar, pois após a comprovação das propriedades medicinais de diversas plantas, a flora se tornou um recurso vantajoso de compostos com importantes funções na prevenção e no tratamento de doenças e na melhoria da saúde (SILVA, BARREIRA e OLIVEIRA, 2016).

O uso de produtos naturais é uma boa estratégia para o descobrimento de novos medicamentos, pois estudos epidemiológicos têm demonstrado fortes evidências que sugerem que a dieta contendo frutas e vegetais pode contribuir para redução de câncer nos seres humanos (JAYAPRAKASHA et al., 2008). Segundo a organização mundial da saúde, 25% dos remédios modernos são feitos a partir de plantas utilizadas tradicionalmente na medicina popular (WHO 2002).

De acordo com Lewington (1993), em 1993, mais de 35.000 espécies de plantas eram utilizadas para fins medicinais em todo o mundo. Acredita-se que os constituintes fitoquímicos das plantas medicinais, tais como flavonoides e compostos fenólicos têm numerosas ações terapêuticas e são capazes de reduzir o risco de diversas doenças, incluindo doenças inflamatórias e câncer (KARIMI, JAAFAR, AHMAD, 2013).

Industrialmente, plantas têm sido utilizadas para diferentes propósitos, incluindo ingredientes de produtos medicinais, potencializadores de beleza, fragrâncias e alimentos (MOHAMMAD-AZMIN et al., 2016). No caso de potencializador de beleza, os componentes naturais de produtos herbais são facilmente absorvidos pela pele humana (CHUA et al., 2011) e é seguro e compatível com o corpo humano, pois não tem apresentado nenhuma toxicidade (MOHAMMAD-AZMIN et al., 2016). A inclusão de produtos naturais em fórmulas de cuidado com a pele tem demonstrado boas propriedades emolientes (JIMENEZ-CARMONA,

1999) e eficiente efeito antioxidante (EIKANI, GOLMOHAMMAD, ROWSHANZAMIR, 2007).

Todas as coisas vivas, desde células bacterianas até todos os milhões de células nas plantas, produzem compostos químicos para auto-sobrevivência e subsistência. Os compostos produzidos por sistemas biológicos podem ser divididos em dois grupos distintos que são os metabólitos primários e os metabólitos secundários. Os metabólitos primários são substâncias químicas essenciais para a manutenção, crescimento e desenvolvimento celular tais como carboidratos, aminoácidos, proteínas e lipídios, já os metabólitos secundários são substâncias de baixo peso molecular importantes para aumentar a sobrevivência global e habilidade de proteção por meio de interação com o meio como, por exemplo, compostos fenólicos, alcaloides ou terpenos (AZMIR et al., 2013; SCALBERT, WILLIAMSON, 2000). Plantas e seus constituintes são uma excelente fonte de pesquisa, pois seus compostos bioativos, produtos de seu metabolismo, agem de forma similar àqueles que operam em seres humanos e animais (GURIB-FAKIM, 2006).

A produção de metabólitos secundários em diferentes espécies depende de seu processo de crescimento e de requisitos específicos das espécies. Diversos estudos têm mostrado que a produção de metabólitos secundários depende do processo de crescimento do vegetal, da espécie, do clima, do solo e condições de colheita (AZMIR et al., 2013).

A já conhecida relação entre alimentação e fisiologia tem aumentado o interesse da inserção dos chamados alimentos funcionais na dieta cotidiana, estes alimentos são definidos como alimentos naturais ou processados que contêm compostos biologicamente ativos em quantidade e qualidade significativos e que forneçam benefícios a saúde clinicamente comprovados e documentados, sendo assim uma importante fonte na prevenção, controle e tratamento de doenças crônicas dos tempos modernos (MARTIROSYAN, 2011).

Antioxidantes naturais presentes em frutas e vegetais podem ser extraídos de suas matrizes originais e se tornarem disponíveis para serem empregados como ingredientes funcionais em alimentos fortificados (BAIANO e DEL NOBILE, 2016). Uma importante fonte de antioxidantes é constituído por resíduos sólidos do processamento mínimo de frutas e vegetais tais como casca, semente, caules e outras frações lignocelulósicas que são normalmente descartadas (LAROZE, ZÚÑIGA, SOTO, 2008). O termo antioxidante se refere a compostos que podem cancelar ou inibir a oxidação de várias moléculas, inibindo a iniciação ou propagação da reação em cadeia da oxidação (VELIOGLU et al., 1998) e agindo

como agentes redutores, realizando varredura de radicais livres, complexantes de potenciais metais pro-oxidantes e como quelantes de oxigênio singlet (BREWER, 2011).

Com o aumento da demanda por produtos naturais que trazem benefícios à saúde, a identificação do método mais efetivo para extração de compostos ativos de plantas tem se tornado importante. Tradicionalmente, extratos herbais, preparados fervendo em água raízes, folhas ou toda a planta, método conhecido por tisane ou decocção, têm sido utilizados para práticas medicinais a mais de 5.000 anos (NUNN, 2002, MOHAMMAD-AZMIN et al., 2016).

Este aumento da demanda também se deve ao aumento da consciência dos possíveis efeitos colaterais causados pelo uso de produtos de origem química. Processos de extração são necessários para a obtenção dos ingredientes ativos utilizados na formulação de produtos naturais sendo extremamente importantes, pois a escolha do método irá determinar a qualidade e quantidade da liberação de analitos da matriz vegetal para o extrato afetando diretamente o produto final obtido e suas propriedades (MOHAMMAD-AZMIN et al., 2016, ESCARPA, GOZALEZ, 2001).

Devido à importância dos processos de extração e da alta demanda por produtos naturais, uma das áreas com mais pesquisas na ciência e tecnologia de alimentos atualmente é a extração, caracterização, viabilização e aplicação de novos ingredientes naturais com atividade biológica que podem ser incorporados em alimentos funcionais visando o bem estar dos consumidores, pois estes ingredientes podem agir como potenciais candidatos no combate à patologias relacionadas à oxidação celular (SILVA, BARREIRA e OLIVEIRA, 2016, OZEN, DEMIRTAS, AKSIT, 2011).

A aplicação de tecnologias avançadas à extração tais como assistida por enzimas, fluido pressurizado, fluido supercrítico, assistida por ultrassom, assistida por micro-ondas e campo elétrico pulsado têm demonstrado oferecer um extraordinário potencial em termos de elevar a taxa de extração de compostos antioxidantes. Além de otimizar condições de extração, estas técnicas são adequadas para ampliação e aplicação industrial e apresentam a vantagem de serem alternativas ecológicas uma vez que utilizam solventes atóxicos e de baixo custo (BAIANO e DEL NOBILE, 2016).

O método tradicional de ferver ervas para obtenção de compostos fitoquímicos requer um longo tempo de extração; por este motivo métodos de extração mais modernos tais como extração assistida por ultrassom, extração assistida por micro-ondas, extração com fluido supercrítico, extração com pressão ultra alta e extração com líquido pressurizado têm sido estudadas como alternativas para extrações mais rápidas e eficientes obtendo extratos de alta

qualidade (MOHAMMAD-AZMIN et al., 2016). Estes métodos são normalmente afetados por fatores comuns tais como propriedades da matriz vegetal, solvente, temperatura, pressão e tempo de contato entre o solvente e a matriz vegetal (HERNÁNDEZ, LOBO e GONZÁLEZ, 2009).

Antes de realizar extração, as plantas devem ser pré-processadas, devendo ser secas para diminuir a atividade de água e assim prevenir o crescimento de bactérias e restringir o crescimento de fungos durante o armazenamento que antecede o processo (SIM, KUMARESAN, SARMIDI, 2004).

A efetividade de produtos nutracêuticos na prevenção de doenças depende da estabilidade, bioatividade e biodisponibilidade de ingredientes ativos (FANG e BHANDARI, 2010). As condições de extração são determinantes da bioatividade de compostos naturais; estes compostos podem ser classificados como compostos hidrofílicos (polares) ou hidrofóbicos (apolares) e o grupo presente no extrato depende, principalmente, do solvente utilizado. Compostos fenólicos, flavonoides, ácidos orgânicos e açúcares são exemplos de compostos polares e carotenoides, alcaloides, terpenos, ácidos graxos, tocoferóis e esteróis são exemplos de compostos apolares. Os compostos bioativos de plantas também podem ser caracterizados de acordo com sua distribuição na natureza como pouco distribuídos (fenóis simples, aldeídos e pirocatecol), amplamente distribuídos (flavonóides e compostos fenólicos) ou polímeros menos abundantes (taninos e ligninas) (BRAVO, 1998; SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Em geral, compostos bioativos de plantas podem ser definidos como metabólitos secundários que causam efeitos farmacológicos ou tóxicos em humanos e animais que podem ser identificados e caracterizados a partir de extratos de raízes, pedúnculos, cascas, folhas, flores, frutos ou sementes (BERNHOF, 2010). Os mais abundantes tipos de antioxidantes contidos em frutas e vegetais incluem vitamina C, carotenoides, e fenólicos, enquanto que tocoferóis e tocotrienóis estão presentes em relativamente baixos níveis em frutas e vegetais quando comparado com castanhas e grãos (KALT, 2005). Os efeitos dos compostos bioativos naturais incluem, de forma mais específica e anti-inflamatória, modulação do sinal de transdução e expressão genética que leva à indução de apoptose e necrose (JACOB et al., 2012). Além disso, pigmentos de plantas tais como antocianinas e antocianidinas podem quelar metais e doar hidrogênio para radicais oxigênio, diminuindo assim a oxidação via dois mecanismos (BAIANO e DEL NOBILE, 2016).

Os compostos funcionais naturalmente presentes nas plantas têm sido propostos para exercer ação biológica através de vários mecanismos tais como varredura de radicais livres, regulação da produção de radicais por meio da eliminação de seus precursores, quelação de metais, inibição de enzimas envolvidas em espécies reativas de oxigênio, elevação e proteção de antioxidantes endógenos, modulação dos sistemas de transmissão e funções mitocondriais. No caso dos polifenóis, sua ação antioxidante é resultado da capacidade de quebra da cadeia de peroxidase (JACOB et al., 2012).

Em relação aos compostos fenólicos, que normalmente estão presentes em maior quantidade em frutas do que em vegetais, dados epidemiológicos têm indicado efeitos na prevenção de diversas doenças incluindo câncer, doenças cardiovasculares e desordens neurodegenerativas (HSU e YEN, 2008; CHUA et al., 2011; KANG et al., 2013; BAIANO e DEL NOBILE, 2016). Tsao e Deng (2004) reportaram que os ácidos fenólicos provenientes de plantas, possuem ação antioxidante superior à ação antioxidante da vitamina C.

A maior parte dos compostos antioxidantes não podem ser sintetizados pelo corpo humano, devendo ser introduzido através de uma dieta rica em frutas e vegetais. Deve-se atentar ao fato de alimentos como óleo de oliva e vinho, que são conhecidos por ter uma alta capacidade antioxidante, apresentam baixa contribuição para a capacidade antioxidante total da dieta, pois esta depende da quantidade ingerida que normalmente é baixa (BAIANO e DEL NOBILE, 2016).

Flavonóides têm sido utilizados para prover a saúde humana devido às suas múltiplas funções tais como ações anti-inflamatória (YAMAMOTO e GAYNOR, 2001), antimicrobiana (CUSHNIE e LAMB, 2005), antioxidante (SHAHIDI, JANITHA e WANASUNDARA, 1992), anticâncer (WEI et al., 1990) e prevenção à osteoporose (MIGLIACCIO e ANDERSON, 2003).

Ingredientes funcionais podem ser absorvidos pelo organismo humano por um processo ativo ou por difusão passiva através de uma membrana. Estruturas complexas devem ser quebradas durante a digestão antes dos ingredientes ativos serem absorvidos (LIPINSKI et al., 2012).

2.3 Extração com Fluido Supercrítico (SFE)

Nas últimas décadas, surgiram tendências de consumo notáveis, como a maior preocupação com a qualidade e a segurança dos alimentos e medicamentos, as regulamentações para os níveis nutritivos e de toxicidade e a maior preferência por

substâncias naturais em vez de substâncias sintéticas. Além disso a atual crença popular de que tudo o que é natural é saudável, provoca o crescimento de indústrias processadoras de produtos naturais nos ramos da alimentação, aromas, perfumaria e fármacos (MUKHOPADHYAY, 2000).

A extração com fluido supercrítico (SFE) é o processo de separação de um componente de outro usando fluido supercrítico como solvente de extração e atende a essa tendência atual, pois é uma tecnologia verde que, dependendo do solvente utilizado, não deixa resíduos no extrato. A química verde tem como filosofia desenvolver e incentivar a utilização de procedimentos que reduzam o uso ou a produção de substâncias altamente tóxicas e perigosas também para o meio ambiente (MUSTAFA, TURNER 2011).

SFE é uma técnica rápida e quantitativa para extrair óleo essencial de plantas aromáticas (MOHAMMAD-AZMIN et al., 2016) além de ser a técnica mais estável para extração e separação de óleo essencial e seus derivados para aplicação em alimentos, cosméticos, fármacos e outros ramos industriais relacionados (KARALE CHANDRAKANT et al., 2011).

A extração com fluido supercrítico apresenta várias vantagens sobre os métodos tradicionais de extração, tais como o uso de baixas temperaturas, baixo gasto de energia e obtenção de produtos de alta qualidade devido à ausência de solventes orgânicos na fase soluto (BAIANO e DEL NOBILE, 2016).

O emprego desta tecnologia resulta em óleos essenciais de alta qualidade, apresentando composição comercialmente vantajosa quando comparado com produtos obtidos pelo uso de processos convencionais de destilação a vapor (EHLERS et al., 2001).

Na extração com SFE, as propriedades físico-químicas do fluido de extração tais como densidade, viscosidade, difusividade e constante dielétrica podem ser facilmente controladas variando a pressão e temperatura de extração sem cruzar os limites de fase (BRAVI et al., 2007).

Uma das vantagens do emprego de SFE é a possibilidade de realizar extração em temperaturas próximas à temperatura ambiente prevenindo assim a termodegradação de compostos de interesse (KARALE CHANDRAKANT et al., 2011).

O sistema de extração supercrítico deve conter basicamente uma bomba para o dióxido de carbono, uma célula de pressão para conter a amostra, um meio para manter a pressão do sistema e um vaso de coleta. Neste sistema, o líquido é bombeado para uma zona de aquecimento onde será aquecido até atingir condições supercríticas, passando então pela

célula de extração onde rapidamente se difunde na matriz sólida e solubiliza o material a ser extraído, arrastando-o para o frasco de coleta resfriado à baixa pressão, local em que o fluido sofre transformação de fase, passando do estado supercrítico para o gasoso e o extrato sedimenta, ficando, assim, livre de solvente. O fluido resultante desta separação pode ser resfriado, re-comprimido e reciclado ou, dependendo do fluido utilizado, pode ser descarregado para a atmosfera (BAIANO e DEL NOBILE, 2016).

Regulamentos recentes sobre o uso de solventes perigosos, cancerígenos ou tóxicos, bem como os elevados custos de energia para a regeneração de solventes orgânicos restringiu o crescimento das indústrias de extratos naturais, fazendo com que novas técnicas fossem pesquisadas, propulsionando assim as pesquisas envolvendo a tecnologia de extração com fluido supercrítico um solvente seguro, GRAS (Generally Recognized as Safety) (MUKHOPADHYAY, 2000).

Na região supercrítica obtêm-se a máxima capacidade de solvatação e a maior variação nas propriedades do solvente com pequenas alterações na pressão e temperatura. A difusividade do solvente facilita a rápida transferência de massa e a finalização da extração mais rápida quando comparada à extrações com solventes líquidos. A baixa viscosidade e baixa tensão superficial, característica de gases, facilita a penetração na matriz vegetal, facilitando assim o acesso ao composto de interesse (MUKHOPADHYAY, 2000).

Dióxido de Carbono é o fluido mais utilizado em SFE devido às suas características particulares tais como condição crítica moderada, alta disponibilidade, baixa toxicidade, não ser inflamável, ser quimicamente estável, não reagir com os compostos de interesse e nem com o equipamento além de não deixar resíduos no produto final, o que implica que o extrato não precise passar por nenhum outro processo para purificação ou concentração (MOHAMMAD-AZMIN et al., 2016). A seletividade de extração pode ser aumentada variando pressão e temperatura de extração e utilizando co-solventes como modificadores de polaridade (BAIANO e DEL NOBILE, 2016).

O CO₂ supercrítico é o solvente mais utilizado até mesmo industrialmente para extração de produtos naturais para fins alimentícios e medicinais por ser inerte, barato, amplamente disponível, inodoro, insípido, ambientalmente amigável, GRAS, e principalmente por não deixar resíduos no extrato devido ao fato de ser gás à temperatura e pressão ambiente (MUKHOPADHYAY, 2000).

Um dos maiores benefícios do uso de CO₂ em SFE, além da redução dos riscos ambientais e à saúde advindos do uso de solventes orgânicos (GENG et al., 2007), refere-se ao estado supercrítico. Neste estado existe apenas uma fase de fluido com propriedades que se

assemelham à uma fase intermediária entre gás e líquido (MOHAMMAD-AZMIN et al., 2016). O dióxido de carbono possui ponto crítico em temperatura de 31,1°C e pressão de 73,8 bar (Figura 1) nesta condição ou em pontos acima dela, o CO₂ apresenta características semelhantes à gases tais como alta difusidade e baixa viscosidade e características semelhantes à líquidos como o alto poder de solvatação devido à alta densidade, por exemplo (CLIFFORD, 1993).

Figura 1 - Diagrama de fases para o dióxido de carbono (CO₂).

Fonte: Própria autoria, 2018

Devido a seu baixo calor latente de vaporização, baixa energia é requerida para o CO₂ atingir o seu estado gasoso na saída do sistema de extração, sendo menor do que a energia gasta com a destilação com solventes orgânicos convencionais (MUKHOPADHYAY, 2000).

O uso de CO₂ como solvente tem fornecido uma excelente alternativa aos solventes orgânicos empregados na extração de compostos bioativos de ervas e outras plantas medicinais apresentando a vantagem de ser mais ambientalmente amigável do que a maior parte das técnicas que empregam solventes orgânicos (MOHAMMAD-AZMIN et al., 2016). Vale ressaltar que o CO₂ comercial utilizado na extração supercrítica, não apresenta risco para o incremento da camada de ozônio pois já está presente no meio ambiente, sendo obtido como co-produto da fermentação do processo de fermentação industrial (MUKHOPADHYAY, 2000).

No entanto, este método apresenta a desvantagem de sua eficácia ser afetada por diversos parâmetros tais como pressão, temperatura, tempo de contato e solubilidade (ARCEUSZ, WESOŁOWSKI e KONIECZYNSKI, 2013). O que justifica o estudo da solubilidade de compostos oriundos de produtos naturais em CO₂ supercrítico ou a otimização destes processos de extração em função da fonte utilizada e do extrato que se pretende obter.

Em geral, a extractabilidade de compostos com CO₂ supercrítico depende da ocorrência de grupos funcionais individuais, do peso molecular e de sua polaridade. Para a extração de certas classes de produtos um cossolvente é também misturado ao CO₂ supercrítico para aumentar a polaridade e consequentemente aumentar a gama de produtos solúveis. Etanol, acetato de etila e água são os melhores cossolventes usados na obtenção de produtos de grau alimentício (MUKHOPADHYAY, 2000).

A primeira aplicação de SFE em alimento data de antes da década de 70 quando esta técnica foi utilizada para a descafeinação de grãos de café, empregada industrialmente para tal até os dias atuais. Mais tarde, quando o SFE foi reconhecido com um procedimento “verde” sua aplicação foi impulsionada e diversos ingredientes nutracêuticos tais como carotenoides, esteróis, tocoferóis e polifenóis têm sido extraídos utilizando esta metodologia (SRINIVAS e KING, 2010).

Algumas aplicações SFE em produtos naturais e indústrias alimentícias são: descafeinização de café e chás, desodorização de óleos e gorduras, extração de óleo vegetal de sementes em flocos e de grãos, obtenção de saborizantes, fragrâncias, aromas, extração do amargor do lúpulo, obtenção de extratos medicinais, estabilização de sucos de frutas, extração de lanolina de lã, descolesterização de gema de ovo e de tecidos animais, extração de compostos antioxidantes de matrizes vegetais, obtenção de corantes alimentícios de origem natural, obtenção de pesticidas naturais e retirada da nicotina do tabaco (MUKHOPADHYAY, 2000).

Contudo, apesar de vastas pesquisas e de desenvolvimentos realizados na tecnologia supercrítica nos últimos 50 anos, com um amplo espectro de aplicação, e uso de diversos solventes tais como H₂O supercrítica e outros gases também no estado supercrítico, apenas o processo de extração com CO₂ supercrítico que recebeu aceitação mais significativa para a exploração comercial, especialmente para extratos de produtos naturais com baixo rendimento e alto valor agregado (MUKHOPADHYAY, 2000).

2.4 Extração com Líquido Pressurizado (PLE)

A extração com líquido pressurizado (PLE) é uma técnica emergente com origem recente, sendo descrita pela primeira vez em 1995 (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2005). A extração com líquido pressurizado é realizada com os mesmos solventes orgânicos utilizados em técnicas tradicionais, porém aplicando alta pressão e temperatura, o que faz com que a PLE apresente vantagens como a possibilidade de realizar extração a partir de amostras frescas, baixo tempo de extração, automação, boas cinéticas de extração e baixo volume de solvente empregado (SILVA, BARREIRA e OLIVEIRA, 2016). Diversos tipos de compostos têm sido extraídos com esta técnica, mais especificamente, vitaminas, compostos fenólicos e carotenoides (SILVA, BARREIRA e OLIVEIRA, 2016).

Uma grande vantagem da PLE sobre os métodos convencionais de extração por solventes é a de que os solventes sob maior pressão permanecem no estado líquido durante todo o processo, mesmo estando acima dos seus pontos de ebulição o que permite alta temperatura de extração mantendo as características desejáveis de líquido tais como aumento da solubilidade e melhora na cinética de dessorção dos compostos bioativos a partir das matrizes (MOHAMMAD-AZMIN et al., 2016). De acordo com Kaufmann e Christen (2002) PLE pode aumentar a difusividade do solvente o que leva a um aumento na velocidade e na eficiência da extração. Assim, alguns solventes que não são eficientes em, por exemplo, extrair antocianinas e outros polifenóis em baixas temperaturas, podem ser muito mais eficientes para as temperaturas elevadas usadas no PLE (SANTOS, VEGGI e MEIRELES, 2012). No entanto, esta tecnologia é normalmente aplicada na extração de compostos termicamente estáveis e talvez este seja o motivo de haver poucas publicações que envolvem PLE na obtenção de compostos nutracêuticos (MOHAMMAD-AZMIN et al., 2016).

Nesta técnica de extração, uma amostra sólida é empacotada em uma célula de extração de ácido inoxidável e sofre extração com um solvente adequado sob condições de pressão, temperatura, volume de solvente e tempo de contato controlados e o extrato é então purgado para um frasco de coleta com ajuda de Nitrogênio. Normalmente emprega-se curtos períodos de tempo de contato entre a amostra e o solvente (GARCIA-SALAS et al., 2010). Esta técnica é considerada uma tecnologia verde, pois pode-se utilizar solventes de baixa toxicidade e em baixas quantidades (MUSTAFA e TURNER 2011).

Dois fenômenos favoráveis ocorrem simultaneamente na extração PLE que são a redução da viscosidade do solvente e o aumento da solubilidade do soluto no solvente.

Adicionalmente, o emprego de altas temperaturas promove a quebra das interações da matriz vegetal possibilitando a difusão do soluto na superfície da matriz. Nesta técnica, o tempo de extração é reduzido quando comparado a técnicas convencionais o que minimiza a degradação dos compostos de interesse pela temperatura (BELANDRIA et al., 2016).

As extrações realizadas segundo esta metodologia podem ser conduzidas em condições estáticas ou dinâmicas ou com combinação entre elas. No modo estático ou batelada, a amostra é empacotada na célula do extrator, o solvente é injetado, o solvente permanece em contato com a amostra por um determinado período de tempo para que ocorra a migração dos compostos de interesse para o solvente e em sequência o solvente é purgado, juntamente com nitrogênio, para um frasco de coleta. No modo dinâmico, o solvente é bombeado continuamente através da amostra e recolhido em um frasco de coleta. Ambos os modos de operação possuem vantagens e desvantagens, a extração no modo dinâmico tem a desvantagem de requerer grande quantidade de solvente o que resulta na diluição do extrato e maior impacto para o meio ambiente; a extração no modo estático necessita, por outro lado, de maior um tempo maior de contato com a amostra porém minimiza o consumo de solvente e o impacto no meio ambiente. Por este motivo normalmente utiliza-se uma combinação entre as técnicas a fim aproveitar as vantagens e minimizar as desvantagens de cada modo de operação (BELANDRIA et al., 2016).

A PLE, também conhecida como extração por solvente acelerado (ASE) apresenta resultados similares aos de Soxhlet, em termos de recuperação, repetibilidade, recobrimento e seletividade na extração, no entanto, tanto os tempos de extração como o consumo de solvente sofrem considerável redução (CASTRO-PUYANA et al., 2013, OLIVEIRA et al., 2014).

O aumento da temperatura diminui a viscosidade do solvente fazendo com que haja uma melhor penetração na matriz vegetal e aumento da difusividade. A redução do tempo de extração permite uma preservação da matriz vegetal e, conseqüentemente, de seus compostos bioativos. A alta pressão, característica da PLE, força o solvente ao interior da matriz, o que facilita a extração dos compostos de interesse, ao passo que a alta temperatura promove a solubilidade mais elevada do analito, pelo aumento da taxa de transferência de massa e pela diminuição da viscosidade da tensão superficial dos solventes, ocorre uma maior eficiência na extração. No estado líquido, é possível obter rendimentos mais elevados de extratos num tempo mais curto utilizando volumes significativamente menores de solventes do que em métodos de extração convencionais (CASTRO-PUYANA et al., 2013).

PLE é utilizado com sucesso na extração de compostos fenólicos, ligninas, carotenoides, α -tocoferol de cereais, frutas, vegetais e de resíduos de indústria de vinífera,

obtenção de óleos essenciais e outros nutracêuticos advindos de alimentos e ervas (MUSTAFA e TURNER, 2011, SAINI e KEUM, 2016).

Esta técnica oferece diversas vantagens sobre os métodos de extração convencionais tais como o baixo volume de solvente empregado e redução do tempo de extração o que faz com que esta seja uma tecnologia ambientalmente amigável, pois a baixa quantidade de solvente empregado ajuda a diminuir o uso de solventes orgânicos na extração (SAINI e KEUM, 2016).

Em adição, este método de extração, assim como a tecnologia supercrítica, utiliza ambiente livre de oxigênio e luz o que tem promovido sua ampla utilização na extração de compostos nutracêuticos (STALIKAS, 2007). Além dos solventes comumente utilizados nos processos PLE como metanol, etanol, isopropanol, acetona, hexano e éter dietílico, a água tem sido cada vez mais utilizada na extração de compostos fenólicos, como ácidos fenólicos e flavonóides, devido a sua alta polaridade, constante dielétrica e capacidade de entumescimento (ONG, CHEONG e GOH, 2006; HERRERO, CIFUENTES e IBAÑEZ, 2006).

3. Objetivos

3.1 Objetivos gerais

Estudar os processos de extração que empregam CO₂ supercrítico (SFE) e líquido pressurizado (PLE) em Araçá e avaliar composição, atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos obtidos.

3.2 Objetivos específicos

- Obter óleo essencial de araçá por SFE utilizando CO₂ supercrítico como solvente;
- Obter extrato do resíduo sólido retirado da SFE empregando PLE, utilizando etanol como solvente (um solvente seguro para a saúde), otimizando as variáveis de processo (temperatura e tempo de contato) para obtenção de melhores rendimentos e atividades destes extratos;
- Analisar perfil de voláteis do extrato obtido via SFE;
- Quantificar o conteúdo de compostos fenólicos totais dos extratos obtidos via PLE;
- Determinar atividade antioxidante dos extratos obtidos via SFE e PLE;
- Determinar atividade antimicrobiana dos extratos obtidos via SFE e PLE;
- Avaliar as alterações causadas na matriz vegetal por diferentes técnicas de extração.

4. Material e métodos

4.1 Preparo de amostra

No Laboratório de Tecnologia de Alta Pressão e Produtos Naturais (LTAPPN) do Departamento de Engenharia de Alimentos da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, os frutos colhidos ao final de cada dia do mês de fevereiro, março e abril de 2016 com o mesmo grau de amadurecimento, foram lavados em água, partidos ao meio e secos à 45 °C em estufa com circulação forçada de ar até peso constante. Aplicou-se baixa temperatura de secagem com o intuito de evitar degradação de possíveis compostos voláteis termosensíveis e posteriormente triturou-se em liquidificador (WALITA, Ri 1710, Varginha, BR), acondicionou-se em sacos de polietileno e armazenou-se a -22 °C.

Os frutos da espécie *Psidium grandifolium* Mart. ex DC. cultivada no município de Pirassununga, localizado na região Centro-Leste do estado de São Paulo (latitude 21°59'46" Sul, longitude 47°25'36" Oeste, altitude de 625 metros) (CIDADE-BRASIL, 2012), foram gentilmente doados pelo Prof. Dr. Rogério Lacaz-Ruiz. O fruto foi identificado pela Profa. Dra. Andreia Alves Rezende do Departamento de Biologia e Zootecnia da Faculdade de Engenharia da UNESP de Ilha Solteira. O material testemunha está depositado no Herbário desta instituição (HISA) com o número de registro 10322.

4.2 Caracterização da amostra

É importante caracterizar a amostra a ser estudada para que se possa ter referências da amostra em questão com outros dados da literatura, pois sua constituição pode variar de acordo com o cultivar, tipo de solo, fertilização, pH do solo e condições climáticas tais como temperatura ambiente, radiação solar e índices de chuva (ADRIAN et al., 2012).

A composição centesimal da amostra fora realizada no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia desta faculdade. Seguindo metodologias descritas pela Associação de Químicos Agrícolas Oficiais (AOAC 2005) calculou-se a composição centesimal por meio da determinação de matéria seca, proteína bruta, fibra bruta, matéria mineral e extrato etéreo.

Na caracterização do leito de extração, determinou-se a granulometria das partículas acondicionadas no leito fixo pelo emprego de um jogo de seis peneiras da série padrão Tyler, com agitação necessária para promover a distribuição das partículas. Para conhecer o

diâmetro das partículas retidas no fundo do jogo de peneiras, realizou-se análise da distribuição de partículas utilizando o analisador de tamanho de partícula por difração a laser SALD-201V (Shimadzu, Kyoto, Japão), o meio de dispersão utilizado foi água destilada. Para o cálculo do diâmetro médio das partículas da matéria-prima utilizou-se a Equação 1,

$$d_m = \log^{-1} \left[\frac{\sum_{i=1}^n (W_i \overline{d_i})}{\sum_{i=1}^n W_i} \right] \quad (1)$$

em que: d_i é a abertura nominal da i -ésima peneira (mm); d_{i+1} é a abertura nominal da peneira maior que a i -ésima peneira (mm); W_i é a massa do material retido na i -ésima peneira (g).

Determinou-se a densidade aparente (ρ_a) através da relação entre a massa de amostra triturada acondicionada em um volume conhecido e o volume do recipiente. A densidade real (ρ_r) foi determinada por picnometria de gás Hélio em picnômetro automático Quantachrome Ultrapyc 1200e (Boynton Beach, Filadélfia, EUA) na central analítica do Instituto de Química da Universidade de Campinas (UNICAMP).

A porosidade do leito (ε) foi calculada pela relação entre a densidade aparente e a densidade real, utilizando a Equação 2.

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (2)$$

A porosidade do leito é um parâmetro relevante para futuros estudos que visem ampliação de escala do extrator, pois está correlacionada com a permeabilidade do leito.

4.3 Obtenção do óleo essencial por meio de extração com CO₂ supercrítico

O processo de extração com emprego de fluido supercrítico consiste em promover o contato entre a matriz vegetal e o gás carbônico no estado supercrítico (CO₂ supercrítico) no extrator em condições preestabelecidas de pressão (P) e temperatura (T). O sistema de extração utilizado foi um TharSFC (Waters, Miliford, USA), cujo esquema de operação é apresentado na Figura2, o qual opera com valores máximos de pressão e temperatura de 500 bar e 120 °C, respectivamente e vazão de solvente de 5 g/min a 10 g/min, podendo ou não utilizar co-solventes (CORNELIO-SANTIAGO, 2015).

O controle da pressão do sistema é realizado pelo acionamento de uma bomba de alta pressão acoplada entre o cilindro de CO₂ pressurizado e o extrator, a temperatura é controlada por meio de um trocador de calor e por termostatos no trocador de calor, no interior do extrator e na parte externa do extrator conectados à um computador.

Figura 2 - Esquema do extrator SFE utilizado neste trabalho.

Fonte: Própria autoria, 2018

O sistema de extração foi operado a 200 bar de pressão e 50 °C. Foi considerado um tempo estático (tempo de contato entre o CO₂ e a matriz vegetal antes da extração dinâmica) de 20 min e 6 h de extração dinâmica com vazão de CO₂ de 5 g/min. As condições de P e T empregadas foram otimizadas por Oliveira, Kamimura e Rabi (2009) para pitanga (fruto pertencente à família Myrtaceae assim como o araçá). No empacotamento do leito fixo foram utilizadas esferas de vidro de 3 mm de diâmetro para completar o volume do extrator.

Visando preservar os compostos voláteis presentes na amostra, o óleo essencial extraído foi continuamente coletado em um frasco imerso em banho de gelo. Para aprisionar os compostos voláteis arrastados pelo CO₂ na saída do sistema, acoplou-se uma armadilha constituída de uma barra de vidro de 5 mm de diâmetro interno preenchida com Porapak-Q® 80/100 mesh (Supelco, Bellefonte, USA) com lã de vidro nas extremidades para suportar o polímero. Esta armadilha foi mantida na saída de gás do frasco de coleta durante as duas primeiras horas de extração dinâmica.

O rendimento da extração foi calculado pela relação entre a massa de extrato obtido e a massa de amostra utilizada para extração.

4.4 Extração com etanol pressurizado

Na obtenção de extratos etanólicos de araquá, a matéria-prima livre de compostos voláteis, que foram previamente extraídos com dióxido de carbono supercrítico, foi empacotada no extrator de leito fixo de um equipamento ASE[®] 150 (Dionex, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA) cujo esquema é mostrado na Figura 3.

A tecnologia de extração com fluido pressurizado acelera o processo convencional de extração usando um baixo volume de solvente a pressão e temperatura controladas, a fim de manter o solvente no estado líquido durante a extração, mesmo quando altas temperaturas são empregadas. A manutenção do solvente no estado líquido só é possível devido à alta pressão (10,3 MPa) exercida pelo equipamento.

Este equipamento opera em bateladas, intercalando tempo estático de contato entre a matriz vegetal e o solvente e extração dinâmica; ao término de cada ciclo o extrato é direcionado para um recipiente de coleta. O tempo estático de contato entre o solvente e a amostra é importante para que ocorra um equilíbrio osmótico entre a matriz e o solvente e a extração seja mais eficiente.

Para estudar a influência de duas variáveis independentes importantes do processo (temperatura e tempo de contato entre o solvente e a matriz em cada ciclo) no rendimento de extração, no teor total de fenólicos no extrato e nas atividades antioxidante e antibacteriana, um delineamento composto central rotacional foi utilizado (DCCR). O equipamento foi operado a pressão fixa de 10,3 MPa e as demais variáveis independentes de extração, número de ciclos e volume de solvente utilizado, foram mantidas constantes em 4 ciclos e volume de 120% do volume extrator (≈ 41 mL). O parâmetro volume do extrator em porcentagem representa a quantidade de solvente que passará pela amostra ao longo dos quatro ciclos excluindo-se a quantidade de solvente utilizada para preencher inicialmente a célula de extração.

Todos os parâmetros adotados foram baseados nas condições dos processos otimizadas por Oliveira et al. (2014) para obter níveis mais elevados de compostos fenólicos no extrato de pitanga, fruto pertencente à família araquá (Myrtaceae). Aproximadamente 5 g da matéria-prima foram utilizados em cada ensaio e o volume do extrator de leito fixo foi completado com pérolas de vidro de 3 mm de diâmetro. No preenchimento da célula de extração intercalou-se uma camada de pérolas de vidro, amostra e outra camada de pérolas de vidro de modo que não houvesse contato entre a amostra e os filtros localizados nas extremidades do leito fixo para evitar possíveis entupimentos dos mesmos.

Figura 3 - Esquema do extrator ASE (PLE) utilizado neste trabalho.

Fonte: Própria autoria, 2018

Os níveis das variáveis independentes utilizadas neste estudo estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores reais dos níveis das variáveis utilizadas no delineamento composto central rotacional (DCCR) para dois fatores.

Variáveis	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Temperatura (°C)	45,9	50	60	70	74,1
Tempo de Contato (min)	3,2	4	6	8	8,8

Fonte: Própria autoria, 2018

Ressalta-se que devido à limitações do equipamento utilizado, as temperaturas e tempo de contato com números decimais da tabela foram substituídas pelos valores correspondentes ao número inteiro mais próximo e com isso, as temperaturas de 45,9 °C e 74,1 °C foram substituídas por 46°C e 74°C, respectivamente e os tempos de contato de 3,2 min e 8,8 min foram substituídos por 3 min e 9 min, respectivamente.

Os experimentos seguiram um delineamento experimental composto central rotacional (DCCR) apresentado na Tabela 3 no qual realizou-se triplicata do ponto central (ensaios 9, 10 e 11).

Tabela 3 - Planejamento experimental completo não aleatorizado para otimização de extração de extrato de Araçá em etanol pressurizado.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo de contato (min)
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	-1,41	0
6	+1,41	0
7	0	-1,41
8	0	+1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Fonte: Própria autoria, 2018

4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva

As modificações da morfologia da matriz vegetal de araçá acarretada pelos diferentes processos de extração foram analisadas a partir das imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura TM 3000 Tabletop (Hitachi, Tóquio, Japão) no Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos desta faculdade.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite a aquisição de informações como a orientação cristalina das partículas, diferenciação entre elementos, potencial elétrico e campos magnéticos localizados. Os principais benefícios do MEV são a obtenção de imagens de superfície polidas ou rugosas com grande profundidade de campo e alta resolução, permitindo manipulação das imagens, tais como aumento ou diminuição de brilho e/ou contraste além da aparência tridimensional das mesmas que facilita a interpretação. O MEV origina imagens indiretas, isto é, não existe caminho óptico entre a amostra e a imagem, pois a imagem formada nas micrografias é resultado do mapeamento das interações que ocorrem entre elétrons e a superfície da amostra (MANNHEIMER, 2002).

Para o preparo da técnica, aderiu-se uma fita dupla-face de carbono (Ted Pella, Inc, Redding, EUA) a um porta-amostras e espalhou-se uma fina camada de amostra sobre a fita de carbono, de modo a evitar sobreposição de partículas, ajustou-se a altura de trabalho, inseriu-se o conjunto na câmara de leitura, aplicou-se vácuo ao sistema (Figura 4) e procedeu-se a obtenção de imagens em voltagem de 15 kV, com aumento variando de 100 a 3.000 vezes em relação a seu tamanho original. Foram avaliadas amostras de araçá sem tratamento prévio, pós extração com SFE, soxhlet e ASE/PLE (maior e menor rendimento).

Ao equipamento utilizado pode-se acoplar o sistema de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) que possibilita a determinação da composição qualitativa e semi-quantitativa das amostras, a partir da emissão de raios X. A fim de verificar a presença de metais na amostra realizou-se EDS com tempo de aquisição de 30 s, 15 kV, sem revestimento e método de quantificação normalizado para todos os elementos.

Figura 4 - Amostra aderida à fita de carbono (A), Microscópio Eletrônico de Varredura TM 3000 aberto com a amostra na câmara de leitura (B), Microscópio Eletrônico de Varredura TM 3000 em operação, sob vácuo (C).

Fonte: Própria autoria, 2018

4.6 Avaliação da Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante tanto do óleo essencial quanto dos extratos obtidos via PLE com etanol absoluto foi determinada pelo método DPPH•, de acordo com metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) que se baseia na captura do radical orgânico. Neste método o extrato reage com solução de radical DPPH• (2,2-difenil-picrilhidrazila) em etanol provocando redução do DPPH• que pode ser mensurado através da variação da absorbância da solução em um comprimento de onda característico. Na sua forma de radical livre, o DPPH• absorve a 515 nm, porém após a redução do radical esta absorção diminui (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995). A reação de óxido redução é caracterizada pela doação de elétrons pelo radical DPPH• fazendo com que a concentração do mesmo na solução diminua. Uma forma visual de notar a redução do radical é pela alteração da cor violeta da solução que, ao entrar em contato com moléculas antioxidantes, sofre descoloração passando a ter coloração amarelada.

Realizou-se cinética de redução do radical DPPH• para soluções em diferentes concentrações para cada um dos onze extratos obtidos via PLE e para o óleo essencial obtido por SFE. Para isso foram adicionados 50 µL do extrato diluído em metanol a 1.950 µL de solução de DPPH• em metanol. As leituras foram realizadas no tempo zero e a cada 60 s durante 40 min ou até que a leitura se estabilizasse, caso esta ocorresse antes do tempo máximo determinado.

Antes de proceder à análise no óleo essencial, realizou-se 3 extrações líquido-líquido com 20 min sob ação de ultrassom, seguida de centrifugação a 4 °C e 4.500 rcf por 10 min com intuito de separar os compostos polares dos apolares que poderiam interferir na análise pelo acarretamento de turbidez no extrato diluído. As duas primeiras extrações foram realizadas utilizando metanol como solvente e a terceira extração foi realizada com água como solvente e com o extrato metanólico obtido das extrações anteriores como refinado. Estas extrações líquido-líquido foram realizadas conforme descrito por Montedoro et al. (1992).

4.7 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Microbiologia do Departamento de Medicina Veterinária desta faculdade com colaboração da Prof^a. Dr^a. Andrezza Maria Fernandes. Avaliou-se a atividade antimicrobiana tanto dos extratos etanólicos quanto do óleo essencial contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Bacillus subtilis* (ATCC 6623), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 14979), *Listeria monocytogenes* (ATCC 4677) e *Salmonella* (ATCC 13076).

4.7.1 Método de disco de difusão

A atividade antimicrobiana dos extratos de arará foi, inicialmente, determinada qualitativamente pelo método de disco de difusão em que um disco de contendo 15 µL de óleo essencial ou 20 µL de extrato etanólico diluídos em etanol na proporção de 500 mg/mL foi colocado sobre uma placa inoculada com o microrganismo de interesse em caldo cérebro-coração em todas as placas também foram adicionados como controle positivo, um disco contendo antibiótico cloranfenicol e, como controle negativo um disco com 20 µL de etanol. O controle negativo foi utilizado para descartar a hipótese de uma possível inibição

microbiana causada pelo solvente. O conjunto foi incubado em estufa a 37 °C por 24 h e após o período de incubação mediu-se o halo de inibição e comparou-se o mesmo com o halo de inibição dos controles positivos e negativos.

4.7.2 Concentração mínima inibitória

A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Andrade et al. (2010) com algumas modificações.

Para esta análise, as cepas bacterianas puras foram subcultivadas em 10 mL de infusão de Mueller-Hinton e incubadas a 36 °C por 24 h. Em seguida, a absorbância do caldo com os microrganismos foi lida a 625 nm utilizando um densitômetro UV (Detector de Turvação por Suspensão, DEN-1, Riga, LVA) e comparado com um padrão de turbidez 0,5 McFarland equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. A concentração mínima inibitória foi determinada adicionando-se 50 µL de bactéria subcultivada na fase log a 950 µL de extrato diluído em 8 diluições seriadas em caldo Mueller-Hinton. A fase log ou exponencial é a fase do crescimento microbiano em que a reprodução celular encontra-se extremamente ativa, sendo o período de maior atividade metabólica da célula.

A infusão de Mueller-Hinton com cepas bacterianas foi usada como controle positivo e a infusão de Mueller-Hinton sozinha como controle negativo. Após 24 h de incubação a 36 °C, a CMI foi definida como a menor concentração onde não ocorre crescimento microbiano. Os ensaios foram realizados em triplicata. A organização das diluições dos extratos bem como os controles está listada na Tabela 4.

Como não foi possível verificar visivelmente com precisão a CMI por meio do turvamento do caldo, após o período de incubação retirou-se uma alíquota de 50 µL de cada tubo e espalhou-se sobre placas de petri contendo ágar enriquecido com caldo Mueller-Hinton com o auxílio de alça de drigenski e novamente incubou-se a 36 °C por 24 h e após o período de incubação verificou-se o crescimento ou não de colônias na placa.

Determinou-se como concentração mínima inibitória a última diluição em que não houve crescimento microbiano.

Tabela 4 - Diluição e conteúdo dos tubos de ensaio para determinação da concentração inibitória mínima.

Tubo	Diluição	Conteúdo
1	250 mg/mL	950 µL de extrato diluído em etanol a 50 mg/mL e 950 µL de caldo Mueller-Hinton
2	125 mg/mL	950 µL do conteúdo do tubo 1 e 950 µL de caldo Mueller-Hinton
3	62,50 mg/mL	950 µL do conteúdo do tubo 2 + 950 µL de caldo Mueller-Hinton + 50 µL de bactéria
4	31,25 mg/mL	950 µL do conteúdo do tubo 3 + 950 µL de caldo Mueller-Hinton + 50 µL de bactéria
5	15,62 mg/mL	950 µL do conteúdo do tubo 4 + 950 µL de caldo Mueller-Hinton + 50 µL de bactéria
6	7,81 mg/mL	950 µL do conteúdo do tubo 5 + 950 µL de caldo Mueller-Hinton + 50 µL de bactéria
7	3,91 mg/mL	950 µL do conteúdo do tubo 6 + 950 µL de caldo Mueller-Hinton + 50 µL de bactéria
8	1,95 mg/mL	950 µL do conteúdo do tubo 7 + 950 µL de caldo Mueller-Hinton + 50 µL de bactéria
Controle positivo	-	950 µL de caldo Mueller-Hinton + 50 µL de bactéria
Controle negativo	-	1000 µL de caldo Mueller-Hinton

Fonte: Própria autoria, 2018

4.8 Caracterização dos extratos

Os extratos foram caracterizados em relação ao índice de refração (extrato supercrítico), perfil de voláteis por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massas (CG-MS) (extrato supercrítico) e teor de compostos fenólicos totais (extratos etanólicos).

4.8.1 Índice de refração

O índice de refração dos extratos foi mensurado em refratômetro (LAMBDA 2WAJ, ATTO Instruments Co, HK) (Figura 5), em função da luz de sódio no comprimento de onda de 589,3 nm à temperatura de 20 °C. A calibração do aparelho foi feita com água destilada. Para manter a temperatura constante durante as medidas, água proveniente de um banho termostático foi circulada pelo aparelho. O índice de refração obtido nesta temperatura indica se o óleo é rico em lipídeos ou óleo essencial.

Figura 5 - Refratômetro usado para medir o índice de refração a 20°C de extrato SFE de araçá

Fonte: Própria autoria, 2018

4.8.2 Análise do perfil de voláteis em cromatografo gasoso acoplado a espectrofotômetro de massas (CG/EM)

As análises cromatográficas foram feitas em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS) QP 2010 Plus, (Shimadzu, Kyoto, JP) com injetor automático AOC-5000 (Bellefonte, USA), com coluna capilar RtxR-5MS (30 m x 0,25 mm ID x df 0,25 μm , 5% diphenyl/95% dimethylpolysiloxane) (Restek, Bellefonte, USA). Utilizou-se hélio como gás de arraste com pressão interna de 60 psi. A temperatura do injetor foi de 220 °C e a temperatura da interface entre a coluna e fonte de íons foi de 250 °C, com energia de ionização na fonte de 70 eV e faixa de varredura de massas de 50 a 500 m/z. A temperatura do forno seguiu uma rampa linear de 1 °C/min no intervalo de 60 °C a 80 °C e de 3 °C/min até atingir a temperatura de 200 °C, de acordo com a metodologia descrita por Adams (2009).

Os compostos voláteis aprisionados na coluna de Porapak-Q[®] foram dessorvidos por uma extração com solvente usando 2 mL de diclorometano aplicado em uma extremidade da coluna e a solução de diclorometano com compostos voláteis saiu pelo outro extremo da coluna. O óleo essencial foi diluído em diclorometano na proporção de 10 $\mu\text{g/mL}$.

Os compostos foram identificados comparando os espectros de massa experimentais com os da biblioteca de espectros de massa NIST 11 e 11s. O Índice de Retenção Aritmética foi calculado pela Equação 3 como uma ferramenta adicional para a identificação de compostos presentes no óleo essencial de araçá usando uma mistura padrão de uma série homóloga de n-alcanos (C9 - C20) dissolvidos em acetato de etila sob as mesmas condições cromatográficas usadas na separação dos compostos na amostra.

$$AI(x) = 100P_z + 100 \left[\frac{RT(x) - RT(P_z)}{RT(P_{z+1}) - RT(P_z)} \right] \quad (3)$$

em que: P_z é o número de carbonos do n-alceno anterior ao analito; $RT(x)$ é o tempo de retenção do analito; $RT(P_z)$ é o tempo de retenção do n-alceno imediatamente anterior ao do analito; $RT(P_{z+1})$ é o tempo de retenção do n-alceno imediatamente anterior ao do analito.

4.8.3 Compostos fenólicos totais (reativos com Folin-Ciocalteu)

O teor compostos redutores reativos com Folin-Ciocalteu presente nos extratos foi determinado seguindo a metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965) na qual 1 mL do extrato diluído em metanol (1,0 mg/mL) é adicionado a 5 mL de solução reagente de Folin-Ciocalteu diluída em água destilada. Após 10 min de contato, adicionam-se à solução 4 mL de solução aquosa com 7,5% de carbonato de sódio anidro.

Após permanecerem ao abrigo da luz por 2 horas, as amostras foram colocadas em cubetas paralelepípedicas retangulares com 1×1 cm de base e 4,3 cm de altura e medidas de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (Biospectro, Curitiba, BR) sob comprimentos de onda de 760 nm. A amostra controle foi preparada e analisada da mesma maneira que as outras amostras, mas diferentemente das demais, foi aplicado 1 mL de metanol em vez de 1 mL da solução do extrato.

Com o objetivo expressar as absorbâncias medidas nas análises em forma equivalente em ácido gálico (EGA), construiu-se uma curva padrão utilizando soluções de ácido gálico em diferentes concentrações (0,01 mg/mL, 0,02 mg/mL, 0,03 mg/mL, 0,04 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,06 mg/mL, 0,07 mg/mL, 0,08 mg/mL, 0,09 mg/mL e 0,1 mg/mL) que foram analisados da mesma maneira que as amostras diferindo apenas pelo uso de 1 mL de solução de ácido gálico na reação com a solução de Follin-Ciocalteu ao invés do extrato diluído. Todas as reações, tanto com amostra quanto na construção da curva padrão, foram realizadas em triplicata.

4.9 Análise estatística

A influência das variáveis independentes temperatura (T) e tempo estático (St) sobre as variáveis dependentes rendimento, teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante

foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA), gráfico de pareto e análise da superfície de resposta do DCCR estudado. Para isso, utilizou-se o software Protimiza Experimental Design.

5. Resultados e discussão

5.1 Caracterização da amostra

5.1.1 Composição centesimal

Para análise da composição centesimal utilizou-se amostra de araçá seca em estufa de circulação de ar forçada a 45 °C até peso constante e posteriormente triturada. A Figura 6 mostra o araçá *in natura* partido ao meio (a), o araçá partido ao meio após secagem (b) e o araçá seco e triturado (c), forma como foi utilizado nas extrações.

Figura 6 - Araçá *in natura* (a), seco (b) e triturado (c).

Fonte: Própria autoria, 2018

A Tabela 5 apresenta os valores, em porcentagem, expressos em média $\pm$ desvio padrão, da umidade, material mineral (cinzas), proteína bruta, fibra bruta, extrato etéreo e extrato não-nitrogenado presentes na amostra. Vale ressaltar que o teor de umidade apresentado pela amostra (8,51%) não representa a umidade do fruto *in natura* e sim da amostra pré-tratada para a extração (seca e triturada).

Tabela 5 - Composição centesimal.

Análise	Média $\pm$ Desvio padrão(%)
Umidade	$8,51 \pm 0,04.10^{-1}$
Cinzas*	$3,75 \pm 0,01.10^{-1}$
Proteína Bruta*	$6,22 \pm 0,05.10^{-2}$
Fibra Bruta*	$41,14 \pm 0,02.10^{-1}$
Extrato Etéreo*	$2,33 \pm 0,05.10^{-3}$
Extrato Não-Nitrogenado*	$46,56 \pm 0,03.10^{-1}$

*Base seca.

Fonte: Própria autoria, 2018

As análises de composição centesimal também são importantes para delinear os processos de extração, por exemplo, percebe-se que o fruto é composto de aproximadamente 2,3% de extrato etéreo e, sendo o CO₂ supercrítico um solvente apolar, se as condições empregadas no processo de extração forem eficientes, o rendimento de extração deve ser próximo deste valor.

5.1.2 Granulometria

Sendo o tamanho das partículas um dos fatores que afetam o rendimento da extração, o conhecimento da granulometria e da porosidade do leito fixo (amostra empacotada na célula de extração) se faz necessário. Para medir a granulometria, utilizou-se um jogo de peneiras padrão Tyler com agitação mecânica e obteve-se a distribuição de partículas apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 - Massa de amostra retida nas peneiras padrão Tyler utilizadas no cálculo do diâmetro médio de partículas.

Tyler/Mesh	Abertura (µm)	Massa de amostra retida (g)	Amostra retida (%)
10	1700	1,36	0,91
14	1180	4,04	2,69
20	850	23,82	15,85
28	600	22,26	14,81
35	425	23,125	15,39
48	300	32,97	21,94
fundo	-	42,68	28,41

Fonte: Própria autoria, 2018

Baseado na Tabela 6 pode-se inferir que o perfil do tamanho dos grãos da amostra foram 1,36 g com diâmetro $(d) \geq 1700 \mu\text{m}$, 4,04 g com diâmetro $1700 \mu\text{m} > d \geq 1180 \mu\text{m}$, 23,82 g com diâmetro $1180 \mu\text{m} > d \geq 850 \mu\text{m}$, 22,26 g com diâmetro $850 \mu\text{m} > d \geq 600 \mu\text{m}$, 23,12 g com diâmetro $600 \mu\text{m} > d \geq 425 \mu\text{m}$, 32,97 g com diâmetro $425 \mu\text{m} > d \geq 300 \mu\text{m}$ e 42,68 g com diâmetro $< 300 \mu\text{m}$.

Como a massa de amostra encontrada no fundo do jogo de peneiras (diâmetro de partículas menor que $300 \mu\text{m}$) corresponde a 28,41% da massa total utilizada, não podendo, portanto, ser desconsiderado, mediu-se o diâmetro médio destas partículas por difração a laser, utilizando água destilada como meio de dispersão e obtendo um valor de $77,58 \mu\text{m}$ conforme curvas de dispersão do tamanho das partículas apresentadas na Figura 7.

Figura 7 - Análise do tamanho de partículas da amostra por difração a laser.

Fonte: Própria autoria, 2018

Com isso, pode-se inferir que o tamanho médio da totalidade das partículas da amostra de arará utilizada na extração supercrítica, calculado conforme a Equação 1 foi de 321,83 µm.

5.1.3 Porosidade de leito

A porosidade do leito, que também pode ser chamada de fração de vazios, é a fração do volume total que está vazio e é influenciada por vários fatores tais como tamanho, forma e rugosidade das partículas que o compõe, o tipo de empacotamento e a razão entre o diâmetro da partícula e o tamanho da coluna (TADINI, TELIS e MEIRELLES, 2016). Neste cálculo de porosidade consideraram-se apenas os espaços vazios existentes entre as partículas do leito, não computando os poros internos das partículas.

Determinou-se a densidade aparente média da amostra, pela pesagem da massa empacotada no extrator de 32,42 cm³ em 10 repetições para a amostra original (triturada e seca) e 10 repetições para a amostra após extração SFE. As massas obtidas nas pesagens estão apresentadas na Tabela 7.

Considerando-se o valor médio das pesagens e o volume do extrator de leito fixo de 32,42 cm³, determinou-se que a densidade aparente da amostra original que foi de 0,4365 g/cm³ e da amostra após sofrer SFE foi de 0,4719 g/cm³.

Tabela 7 - Massas para a determinação da densidade aparente.

Repetição	Massa de araquá empacotada no leito fixo	
	Amostra original (g)	Amostra após SFE (g)
1	14,08	15,21
2	13,98	15,42
3	13,98	15,44
4	13,98	15,13
5	14,39	15,33
6	14,41	15,31
7	14,08	15,27
8	14,18	15,32
9	14,36	15,25
10	14,05	15,34
Média ± Desvio Padrão	14,15 ± 0,20	15,30 ± 0,09

Fonte: Própria autoria, 2018

A densidade real, determinada por picnometria de gás hélio, tem seus resultados expressos como média e estimativa de desvio padrão de dez determinações, resultadndo em $1,33 \pm 0,01 \text{ g/cm}^3$ para amostra que não havia sofrido extrações e $1,32 \pm 0,01 \text{ g/cm}^3$ para amostra após extração com CO_2 supercrítico que foi utilizada como matéria-prima para a PLE, esta diferença na densidade se deve à retirada da fração lipídica da amostra pela primeira extração aumentando assim a fração de vazios na mesma.

A porosidade de leito foi calculada pela razão da densidade aparente pela densidade real (Equação 2), obtendo 0,328 como porosidade de leito das extrações supercríticas que utilizaram a amostra original como matriz vegetal e 0,357 como porosidade de leito das extrações com etanol pressurizado que utilizaram amostra que já havia sofrido extração SFE como matriz vegetal.

5.2 Rendimento global de extração

5.2.1 Extração com Fluido Supercrítico (SFE)

A SFE foi realizada em condições de pressão e temperatura otimizadas por Oliveira, Kamimura e Rabi (2009). Foram realizadas em quatro repetições, durante 6 h de extração dinâmica. No empacotamento do leito fixo foram utilizadas esferas de vidro de 3 mm para completar o volume do extrator. O rendimento global das extrações com fluido supercrítico, apresentado na Tabela 8, foi obtido pela relação entre a massa do extrato obtido no final da

extração e a massa de araquê empacotada no extrator de leito fixo. O rendimento médio de extrato obtido via SFE foi de 2,32 %, valor que condiz com o extrato etéreo do araquê apresentado na Tabela 5 o que mostra que as condições de extração empregadas (200 bar, 50 °C, 20 min de tempo estático e 6 h de extração dinâmica) foram eficientes e conseguiram extrair toda a fração apolar da amostra.

Tabela 8 - Extração com CO₂ supercrítico à 200 bar e 50 °C por 6 horas.

Extração	Massa de amostra (g)	Massa de Extrato		Rendimento global (%)
		Massa útil (g)	Massa obtida na limpeza da linha de extração (g)	
1	20,0004	0,2602	0,2166	2,3839
2	20,0007	0,2358	0,2224	2,2909
3	20,0001	0,2521	0,2040	2,2804
4	20,0002	0,2507	0,2218	2,3625
Média ± Desvio Padrão				2,3294 ± 0,0004

Fonte: Própria autoria, 2018

5.2.2 Extração com líquido pressurizado (PLE)

A PLE utilizando etanol absoluto como solvente foi feita usando como matéria-prima a amostra de araquê livre de compostos voláteis e lipídicos devido ao pré-tratamento com dióxido de carbono supercrítico. Essa sequência de duas técnicas de extração diferentes foi realizada a fim de se estudar a complementação dos métodos de extração com objetivo de potencializar a extração dos compostos ativos do fruto.

O rendimento global destas extrações, apresentado na Tabela 9, foi obtido pela relação entre a massa do extrato no final da extração e a massa de amostra empacotada no extrator de leito fixo.

A fim de saber se as variáveis de processo estudadas, a temperatura (T) e o tempo estático (St), influenciaram o rendimento da extração, por meio de análises estatísticas, mais especificamente, análise de variância (ANOVA) avaliaram-se os efeitos principais. O Diagrama de Pareto apresentado (Figura 8) mostra que tanto T quanto St influenciam significativamente o rendimento da extração ao nível de 95% de significância e que o efeito da interação entre as variáveis (T × St) não apresentou influência significativa. Verifica-se

também que o efeito do aumento da temperatura sobre a variável dependente (o rendimento) é consideravelmente maior que o efeito do tempo estático.

Tabela 9 - Extração com etanol absoluto pressurizado seguindo DCCR proposto.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais		Massa de extrato (g)	Rendimento global (%)
	T	St	T (°C)	St (min)		
1	-1	-1	50	4	0,5169	10,34
2	+1	-1	70	4	0,7479	14,94
3	-1	+1	50	8	0,6129	12,26
4	+1	+1	70	8	0,8322	16,64
5	-1,41	0	46	6	0,5511	11,02
6	+1,41	0	74	6	0,8760	17,49
7	0	-1,41	60	3	0,6206	12,39
8	0	+1,41	60	9	0,7911	15,82
9*	0	0	60	6	0,6767	13,54
10*	0	0	60	6	0,6939	13,87
11*	0	0	60	6	0,7640	14,48

* Ponto Central

Fonte: Própria autoria, 2018

Figura 8 - Diagrama de Pareto das variáveis T (x_1) e ST (x_2) e a interação T $\times$ ST ($x_1 \cdot x_2$) no rendimento dos extratos de araçá.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Na análise de variância dos modelos tanto de primeira quanto de segunda ordem que possam prever a influência das variáveis do processo (Tabela 10) verificou-se que pelo

menos uma das variáveis estudadas provocou efeito significativo no parâmetro analisado, com um nível de confiança de 95% pois, $F_{\text{calculado}}$ é maior que o F_{tabelado} com 3 graus de liberdade no numerador e 3 graus de liberdade no denominador para o modelo de primeira ordem e o $F_{\text{calculado}}$ é maior que o F_{tabelado} com 5 graus de liberdade no numerador e 5 graus de liberdade no denominador, para o modelo de segunda ordem.

Os coeficientes de regressão calculados (R^2) de 0,97 para ambos os modelos sugerem que os modelos são preditivos para o rendimento do extrato, pois o coeficiente de regressão é uma medida do ajuste de um modelo estatístico em relação aos valores observados que varia de 0 a 1, indicando, em porcentagem, o quanto o modelo se aproxima dos valores experimentais.

Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) para o rendimento no planejamento experimental (Erro residual).

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calculado}	F _{tabelado}
Modelo primeira ordem					
Regressão	23,40	3	7,80	29,25	9,28
Resíduo	0,80	3	0,27		
Total	24,20	6	-		
Modelo segunda ordem					
Regressão	50,10	5	10,00	33,33	5,05
Resíduo	1,50	5	0,30		
Total	51,56	10	-		

$F_{\text{calculado}}$ maior que o F_{tabelado} ao nível de 95% de confiança.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Conforme verificado na ANOVA (Tabela 10), os modelos matemáticos de primeira (Equação 4) e segunda ordem (Equação 5) são preditivos e descrevem o efeito dos fatores temperatura (T), tempo estático (St) e da interação entre eles ($T \times St$) no rendimento de extrato de araçá (Y), em porcentagem. Os termos significativos estão assinalados com (*).

$$Y = 13,72^* + 2,25 T^* + 0,90 St^* - 0,05 TxSt \quad (4)$$

$$Y = 13,96^* + 2,27 T^* - 0,01 T^2 + 1,06 St^* - 0,09 St^2 - 0,05 TxSt \quad (5)$$

Em ambos os casos (Equações 4 e 5), as variáveis temperatura e tempo estático são significativas, porém a interação entre elas não influi significativamente no rendimento de extração.

As Figuras 9 e 10 mostram o ajuste dos valores experimentais em relação aos valores preditos no modelo de primeira e segunda ordem, respectivamente. A análise das figuras corrobora com a informação obtida pelo cálculo do coeficiente de regressão de que os modelos propostos se ajustaram bem aos dados experimentais.

Figura 9 - Diagrama de valores experimentais *versus* valores preditos pelo modelo de primeira ordem para rendimento de extração.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Figura 10 - Diagrama de valores experimentais *versus* valores preditos pelo modelo de segunda ordem para rendimento de extração.

Fonte: Própria autoria, 2018.

A análise da superfície de resposta (ASR), a superfície gerada pelo modelo de segunda ordem (Figura 11) para o intervalo de temperatura e tempo estático considerados no DCCR, mostra que ambas as variáveis influenciam positivamente o rendimento da extração, indicando que quanto maior a temperatura e o tempo estático empregados, maior o rendimento obtido.

Figura 11 - Superfície de resposta gerada pelo modelo de segunda ordem que descreve os efeitos das variáveis independentes no rendimento da extração.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Este processo de extração com solvente líquido pressurizado permite aumentar o tempo de contato entre um ciclo e outro sem utilizar uma maior quantidade de solvente. Este método em batelada faz com que o total de solvente a ser empregado seja dividido pelo número de ciclos que se aplica, então pode-se aumentar o tempo de contato entre a matriz e o solvente sem aumentar a quantidade de solvente empregada na extração. Como detectado (Figura 11) o tempo de contato aumenta a eficiência do processo e, pelo perfil da ASR ainda é possível otimizar aumentando este tempo de contato no processo de extração.

O aumento da eficiência com o aumento da temperatura muitas vezes é esperado, mas nem sempre é o melhor, visto que o emprego de temperaturas elevadas degradam compostos termossensíveis que podem apresentar alguma atividade.

5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Visando entender a alteração morfológica provocada na matriz vegetal pelas diferentes técnicas de extração, analisou-se MEV na matéria-prima, na matriz vegetal após a SFE e nas amostras após a PLE. Para a amostra submetida à SFE seguida de PLE escolheu-se aquelas que apresentaram menor e maior rendimento provenientes dos ensaios 1 e 6 do DCCR, respectivamente (Tabela 9). Também foram analisadas amostras que sofreram extração Soxhlet, durante 6 h, com etanol absoluto.

Para verificar a influência do solvente, na alteração da estrutura da matriz vegetal (araçá), repetiu-se o ensaio 6 do DCCR para extração com PLE (74 °C e 6 min), ensaio com maior rendimento, porém utilizando álcool isopropílico como solvente. O mesmo foi feito com a extração soxhlet, em que o solvente foi substituído por éter etílico.

Das micrografias obtidas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura foi possível observar na Figura 12 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, microestruturas definidas que remetem à formação das paredes celulares vegetais além de microestruturas esféricas com pontos brilhantes que podem ser indicativo da presença de minerais. Na Figura 13 pode-se observar que a extração com dióxido de carbono supercrítico alterou a estrutura das partículas de araçá, um indicativo de que o fluido supercrítico ocasionou ruptura das membranas celulares, permanecendo apenas as estruturas esféricas com pontos brancos brilhantes, porém em tamanho reduzido.

Figura 12 – Micrografia Eletrônica de Varredura da matéria-prima.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Figura 13 – Micrografia Eletrônica de Varredura da amostra pós SFE.

Fonte: Própria autoria, 2018.

A Figura 15 apresenta uma micrografia obtida da matriz vegetal de araquá após as duas extrações consecutivas, SFE seguida de PLE com etanol, na condição de maior rendimento de extração e a Figura 14 apresenta uma micrografia obtida da matriz vegetal de araquá após as duas extrações consecutivas na condição de menor rendimento de extração do DCCR. Intuitivamente infere-se que a condição que promoveu um maior rendimento de extração seja a que tenha causado maior alteração na estrutura vegetal, porém as imagens não retratam isso. Em ambas as imagens pode-se notar um aparente afrouxamento das estruturas celulares possivelmente causado pela quebra das pontes de hidrogênio para possibilitar a extração de grande parte dos constituintes polares das paredes celulares por esta extração. E novamente foram observados pontos brancos brilhantes o que reforça a teoria de que sejam minerais, pois estes não são solúveis em etanol.

Figura 14 – Micrografia Eletrônica de Varredura da amostra pós PLE de maior rendimento do DCCR.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Figura 15 – Micrografia Eletrônica de Varredura da amostra pós PLE de menor rendimento do DCCR.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Ao observar a micrografia gerada pela matriz vegetal que passou por extração SFE seguida de PLE com álcool isopropílico como solvente (Figura 16) notaram-se maiores alterações no arranjo estrutural como se tivesse ocorrido uma compactação das células da amostra, porém continuou-se observando estruturas esféricas com pontos brancos brilhantes.

Figura 16 – Micrografia Eletrônica de Varredura da amostra pós PLE com etanol isopropílico nas condições de maior rendimento do DCCR.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Analisando as micrografias apresentadas nas Figuras 17 e 18, que retratam a estrutura da amostra após extração soxhlet com etanol absoluto e isopropílico, respectivamente, observou-se que aparentemente ocorreu desnaturação da matriz vegetal, provavelmente pela alta temperatura empregada, porém ainda podem-se observar as mesmas microestruturas esféricas com pontos brilhantes que podem ser relativos à presença de minerais na amostra, indicando que nenhum dos solventes testados neste estudo foi capaz de extrair estes compostos. Na Figura 18 verificou-se também o aparecimento de poros na estrutura vegetal.

Figura 17 – Micrografia Eletrônica de Varredura da amostra pós Soxhlet com etanol absoluto.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Figura 18 – Micrografia Eletrônica de Varredura da amostra pós Soxhlet com éter etílico.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Com base na análise das micrografias apresentadas pode-se dizer que a extração com dióxido de carbono e a extração com líquido pressurizado nas condições e solventes testados não acarretaram em grandes alterações nas estruturas das células vegetais da amostra, porém a extração pelo método soxhlet implicou em grande alteração visual destas células, independente do solvente utilizado. Tal alteração provavelmente deve-se à desnaturação causada pela alta temperatura empregada nesta técnica.

5.4 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

Dentre as vantagens do sistema EDS, destacam-se os perfis e mapas químicos que possibilitam o estudo da zonagem das amostras além de apresentar vantagem de rapidez e facilidade na preparação das amostras para análise. Os minerais não condutores de corrente elétrica para serem analisados no MEV/EDS devem ser previamente metalizados por meio de precipitação, a vácuo, de uma película micrométrica de material condutor tal como ouro ou carbono sobre a superfície do mineral, possibilitando a condução da corrente elétrica (Duarte et al., 2003).

De acordo com Appezzato-da-Glória e Carmello-Guerreiro (2006) entre as substâncias inorgânicas encontradas em paredes celulares de vegetais encontra-se oxalato de cálcio na forma de cristais. Para verificar a possível existência de oxalato de cálcio e de outras possíveis substâncias inorgânicas presentes nas amostras de araquá, realizou-se espectroscopia de energia dispersiva (EDS) e os componentes detectados na matéria-prima foram carbono, oxigênio, berílio, fósforo, enxofre, potássio, cálcio, magnésio e cloro, conforme apresentado na Figura 19.

Figura 19 - Espectro gerado pelo EDS da matéria-prima

Fonte: Própria autoria, 2018.

Esta análise possibilitou mostrar a presença de compostos extremamente importantes para a manutenção da saúde e ainda, endossa a hipótese de que os pontos brancos brilhantes presente nas micrografias obtidas por MEV podem representar os minerais presentes no fruto.

O fósforo é um nutriente essencial à saúde humana, pois possui diversos papéis fisiológicos, possuindo tanto função estrutural (componente da camada fosfolipídica, dos ácidos nucleicos e da hidroxiapatita) quanto metabólica (fosforilação oxidativa) (SHERIDAN e LOGOMARSINO, 2017).

O enxofre é um dos elementos mais abundante no corpo humano, podendo ser encontrado tanto em compostos orgânicos e inorgânicos como no estado elementar; este composto possui funções fisiológicas, metabólicas e desintoxicantes (STANKOVIĆ e KIRALJ, 2017).

A ingestão de potássio é benéfica à saúde humana, pois está correlacionada com redução e prevenção de doenças cardiovasculares, renais, osteoporose e diabetes (HE e MACGREGOR, 2008).

O cálcio é um nutriente com importante função estrutural, além de desempenhar papel central em uma ampla gama de funções essenciais, sua deficiência está correlacionada com osteoporose, raquitismo, aumento do risco de cálculos renais, câncer de colón, hipoparatiroidismo, doença intestinal disabsortiva e acidez gástrica sintomática (WEAVER et al., 2011).

O magnésio é um nutriente essencial que possui funções metabólicas (glicólise, síntese de ácidos nucleicos e proteínas), oxidativas, imunológicas e neuromusculares (COSTELLO et al., 2016).

Em complementação às análises bromatológicas, estes resultados também caracteriza a matéria-prima como fonte de importantes minerais como fósforo e potássio, por exemplo.

5.5 Atividade Antioxidante

A cinética da atividade antioxidante do óleo essencial de araquê obtido por SFE e dos extratos etanólicos de araquê obtidos por PLE (Figura 20) foram determinadas utilizando espectrofotômetro (Genesys 10s UV-Vis, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) e expressa na forma de porcentagem de redução do radical DPPH• ao longo do tempo, tal inibição foi mensurada pelo decaimento da absorbância medida em comprimento de onda de 515 nm. Pois quanto menor a absorbância medida, maior a redução do radical DPPH• e, consequentemente, maior o poder antioxidante do extrato. Podem ser observados 3 diferentes comportamentos da

cinética de reação, dependendo da natureza do antioxidante testado, tais comportamentos podem ser classificados como cinética de reação rápida, quando o estado estacionário é atingido em menos de 1 min, cinética de reação intermediária, com o estado estacionário sendo atingido entre 5 a 30 min após o início da reação e cinética de reação lenta que pode levar de 1h a 6h para atingir o estado estacionário (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSSET, 1995).

Ao observar a Figura 20 nota-se que o óleo essencial de araquá (obtido por SFE), nas concentrações testadas, apresentou baixa redução do radical DPPH• apresentando um cinética de reação com comportamento considerado intermediário (Figura20).

Para os extratos etanólicos de araquá o comportamento da curva da cinética de reação variou de acordo com a concentração testada, para concentrações muito baixas (menores que 1 mg/mL) o estado estacionário foi atingido em poucos minutos, em geral até 5 min após o início da reação. Em concentrações intermediárias, entre 5 mg/mL e 50 mg/mL, as cinéticas da reação de óxido-redução apresentaram comportamento mais lento, não tendo atingido o estado estacionário durante o tempo analisado com exceção dos extratos obtidos pelos ensaios 3 e 5 que, com concentração de 50 mg/mL atingiram o estado estacionário em 12 min e 7 min, respectivamente. E, por fim, os extratos etanólicos em altas concentrações, entre 100 mg/mL e 200 mg/mL, apresentaram cinética de extração com comportamento intermediário, atingindo o estado estacionário entre 12 min e 30 min após o início da reação (Figura 20). Vale ressaltar que o potencial antioxidante não é afetado por tal comportamento.

Calculou-se a concentração de extrato necessária para, no estado estacionário, reduzir a quantidade inicial de DPPH• pela metade, tal concentração é denominada concentração eficiente (EC_{50}) e foi calculada para cada extrato através da equação de uma linha de tendência logarítmica obtida à partir dos valores de redução do radical DPPH• no tempo estático em função da concentração do extrato para cada um dos 11 ensaios do DCCR. As concentrações eficientes dos extratos etanólicos de araquá e suas respectivas linhas de tendência estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Concentração eficiente para atividade antioxidante dos extratos etanólicos de araçá e equação das linhas de tendência utilizadas nos cálculos.

Ensaio	Variáveis reais		Linha de tendência		EC ₅₀ (mg/mL)
	T (°C)	St (min)	Equação	R ²	
1	50	4	% redução DPPH• = -0,12 ln (x) + 1,59	0,91	9,31
2	70	4	% redução DPPH• = -0,12 ln (x) + 1,60	0,89	10,60
3	50	8	% redução DPPH• = -0,11 ln (x) + 1,58	0,84	14,00
4	70	8	% redução DPPH• = -0,10 ln (x) + 1,49	0,81	31,04
5	46	6	% redução DPPH• = -0,10 ln (x) + 1,50	0,83	26,32
6	74	6	% redução DPPH• = -0,11 ln (x) + 1,51	0,87	6,37
7	60	3	% redução DPPH• = -0,11 ln (x) + 1,54	0,87	9,13
8	60	9	% redução DPPH• = -0,11 ln (x) + 1,58	0,87	12,49
9	60	6	% redução DPPH• = -0,11 ln (x) + 1,57	0,83	11,40
10	60	6	% redução DPPH• = -0,12 ln (x) + 1,61	0,86	14,59
11	60	6	% redução DPPH• = -0,12 ln (x) + 1,59	0,87	10,70

Fonte: Própria autoria, 2018.

Com base nos valores apresentados na Tabela 11, nota-se que as condições utilizadas no ensaio 6 do DCCR realizado para extrações com etanol pressurizado são as que dão origem ao extrato que apresenta menor EC₅₀, ou seja, ao extrato que apresenta maior atividade antioxidante, além de ser o que apresenta maior rendimento de extração. Esta correlação provavelmente entre maior rendimento e maior atividade antioxidante ocorre devido à solubilização da matriz vegetal para o extrato de compostos diferentes dos compostos solubilizados nos demais ensaios. Especificamente neste caso, o fato de empregar temperatura mais elevada (ensaio 6, Tabela 9), o que acarretou em um maior rendimento da extração, não fez com que houvesse degradação de compostos, assim os componentes com atividade antioxidante extraídos foram resistentes ao maior valor de temperatura empregado.

Figura 20 - Cinética de redução do radical DPPH• por efeito dos extratos de araçá. A) ensaio 1; B) 2; C) 3; D) 4; E) 5; F) 6; G) 7; H) 8; I) ponto central do DCCR; J) óleo essencial da SFE.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Ao avaliar o Diagrama de Pareto gerado pelo modelo linear (Figura 21) notou-se que o tempo estático (St) influencia significativamente no valor de EC_{50} ao nível de 95% de significância e que a variável temperatura (T) e a interação entre elas ($T \times St$) não exercem influencia significativa sobre a atividade antioxidante dos extratos.

Figura 21 - Diagrama de Pareto da influência das variáveis T (x_1) e St (x_2) e da interação TxSt ($x_1.x_2$) sobre a atividade antioxidante de extratos de araçá.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) para os modelos de primeira e segunda ordem para EC_{50} dos extratos etanólicos de araçá (Erro residual).

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	$F_{calculado}$	$F_{tabelado}$
Modelo primeira ordem					
Regressão	303,9	3	101,3		
Resíduo	36,1	3	12,0	8,4	9,28
Total	340,0	6	-		
Modelo segunda ordem					
Regressão	232,1	5	46,4		
Resíduo	345,4	5	69,1	0,67	5,05
Total	577,6	10	-		

$F_{calculado}$ maior que o $F_{tabelado}$ ao nível de 95% de confiança.

Fonte: Própria autoria, 2018.

O extrato que apresentou o maior rendimento e maior atividade antioxidante foi obtido quando alta temperatura foi empregada, mas ao analisar os dados estatisticamente nota-se que, mais uma vez, o tempo de contato entre a matriz e o solvente (St) é a variável que influencia a aquisição de extratos ricos em compostos com atividade antioxidante.

Porém, ao realizar análise de variância para modelos de primeira e de segunda ordem notou-se que estes não são capazes de descrever os dados experimentais com um nível de confiança de 95% pois, $F_{\text{calculado}}$ é menor que o F_{tabelado} em ambos os modelos (Tabela 12). Como a ANOVA mostrou que os modelos não são preditivos não realizou-se análise da superfície de resposta.

O extrato etanólico de araçá obtido pelo ensaio 6 (74 °C e 6 min) apresentou maior atividade do que o extrato das folhas de *Psidium cinereum* Mart. obtidos por infusão (8750 mg/mL) (TAKAO, IMATOMI e GUALTIERI, 2015) e do que outros extratos vegetais descritos na literatura, tais como extrato etanólico de pitanga (23,40 mg/mL) (SANTOS et al., 2015) e óleo essencial de eucalipto (12,60 mg/mL) (DOGENSKI, FERREIRA e OLIVEIRA, 2016) pois seu EC_{50} é menor. Porém apresenta concentração eficiente maior do que o apresentado pelo extrato etanólico de própolis (0,05 mg/mL) (SCHMIDT et al., 2014) e extrato etanólico de cebola ($EC_{50} = 0,04$ mg/mL) (KIM, KIM e PARK, 2013).

A atividade antioxidante dos extratos etanólicos e do óleo essencial de araçá não foram relevantes quando analisados pela metodologia proposta no entanto, ao serem analisados seguindo outra metodologia, pode ser que apresente uma maior atividade antioxidante e, consequentemente, menor concentração eficiente.

5.6 Atividade antimicrobiana

5.6.1 Disco de difusão

A análise qualitativa da atividade antimicrobiana realizada por método de disco de difusão para extratos de araçá obtidos tanto por SFE quanto por PLE, apresentada na Tabela 13, mostrou que todos os extratos testados apresentaram halo de inibição contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, somente o extrato etanólico obtido no ensaio 1 não apresentou inibição contra *Bacillus cereus*, apenas o extrato etanólico correspondente ao ponto central do DCCR e óleo essencial não apresentaram atividade contra cepas de *Listeria monocytogenes* e nenhum dos extratos apresentaram atividade contra cepas de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Salmonella*. Etanol, que foi usado como controle negativo e como solvente, não mostrou um efeito inibitório sobre as cepas testadas. Cloranfenicol que foi utilizado como controle positivo, apresentou efeito inibitório contra todas as cepas estudadas. O halo de inibição (região ao redor dos discos em que não houve

crescimento microbiano) foi medido, com auxílio de régua, apenas para controle da repetitibilidade dos ensaios, seus valores não foram apresentados por se tratar de uma análise qualitativa. Na Tabela 13, o símbolo (+) significa que houve formação de halo de inibição e portanto o extrato apresentou atividade contra cepas da bactéria referente e o símbolo (-) significa que não houve formação de halo de inibição e portanto o extrato não apresentou atividade contra cepas da respectiva bactéria.

Tabela 13 - Dados referentes à atividade antimicrobiana qualitativa de extratos de araçá.

Microrganismo	Coleção	Ensaio											SFE
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6623	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14979	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 4677	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Salmonella</i>	ATCC 13076	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Própria autoria, 2018.

As Figuras 22 e 23 são composta por fotos das placas utilizadas para esta análise, os números de 1 a 11 indicam os diferentes extratos etanólicos obtidos pelos 11 ensaios do DCCR (Tabela 9), SFE indica óleo essencial, (-) indica controle negativo e (+) controle positivo.

A inibição do crescimento microbiano pelo extrato de araçá não fez distinção de cepas Gram (+) ou Gram (-) pois estes apresentaram atividade contra as duas categorias de cepas de bactérias apesar de a literatura reportar que as bactérias Gram (-) sejam mais resistentes às substâncias antibióticas de origem vegetal do que as bactérias Gram (+), teoricamente devido à maior complexidade da parede celular.

Em função do resultado obtido, pode-se notar que o processo influencia na atividade do extrato. Possivelmente, condições de T e St podem favorecer a extração de um componente específico, que se percebe quando o ensaio 1 não apresentou inibição contra *Bacillus cereus*, por exemplo. Um estudo mais detalhado se faz necessário para identificar esta hipótese já que nenhuma correlação estatística foi possível estabelecer com estes dados (Tabela 13).

Figura 22 - Ensaio de disco de difusão para determinação qualitativa da atividade antimicrobiana de extratos de araquá contra cepas de A) *P. aeruginosa*, B) *B. subtilis*, C) *E. coli* e D) *S. aureus*.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Figura 23 - Ensaio de disco de difusão para determinação qualitativa da atividade antimicrobiana de extratos de araquá contra cepas de A) *B. cereus*, B) *L. monocytogenes* e C) *Salmonella spp.*

Fonte: Própria autoria, 2018.

5.6.2 Concentração mínima inibitória

Analisou-se CMI do extrato etanólico obtido pelo ensaio 5 do DCCR, este extrato foi escolhido arbitrariamente por estar entre os que apresentaram maior halo de inibição no experimento com disco de difusão.

A concentração mínima inibitória contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* foram avaliadas e obteve-se 15,62 mg/mL, 15,62 mg/mL, 7,81 mg/mL e 3,91 mg/mL, respectivamente, como

concentrações mínimas que impediram o crescimento destes microrganismos. Não houve crescimento microbiano no controle. Vale ressaltar que neste trabalho foi considerada concentração mínima inibitória aquela em que não houve crescimento de nenhuma colônia de microrganismo, ou seja, quando houve 100% de inibição.

Scur et al. (2016) ao analisar extratos etanólicos de araquá obtidos por rotary shaker, (220 g por 24 min) obteve como MIC 25 mg/mL contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, 3,125 mg/mL contra cepas de *Staphylococcus aureus*, 6,25 mg/mL contra cepas de *Escherichia coli* e 6,25 mg/mL contra cepas de *Bacillus subtilis*. Resultados estes divergentes do encontrado neste trabalho. Este resultado deriva de vários fatores, entre eles a espécie de araquá.

Holetz et al. (2002) reportam que extratos de plantas com MIC menores que 100 µg/mL, apresentam uma boa atividade antimicrobiana (elevado potencial de aplicação farmacológica e alimentícia), entre 100 e 500 µg/mL apresentam atividade moderada, entre 500 e 1000 µg/mL apresentam atividade fraca e acima de 1000 µg/mL apresentam atividade irrelevante. Segundo esta classificação, o extrato etanólico obtido neste trabalho, o qual foi testado (ensaio 5, Tabela 9), embora tenha apresentado atividade contra as bactérias testadas, esta atividade antimicrobiana pode ser considerada de pouca relevância.

5.7 Índice de Refração

O índice de refração é uma característica física constante de cada fluido, variando apenas com a temperatura de determinação e é calculado pela razão entre o seno ângulo de incidência e o seno do ângulo de refração de um feixe de luz passando de um meio menos denso (ar) para um mais denso (extrato supercrítico de araquá).

Determinou-se que índice de refração do extrato de araquá obtido via SFE a 20°C é de 1,485. Segundo Baser e Buchbauer (2010) o índice de refração de óleos essenciais a 20°C varia de 1,450 a 1,590, confirmando que o extrato de araquá obtido por extração com CO₂ supercrítico pode ser considerado um óleo essencial.

5.8 Perfil de voláteis

A composição volátil deste óleo essencial foi analisada tanto para a fração capturada na armadilha composta por uma coluna de Porapak-Q[®] na saída do extrator quanto para os

constituintes do próprio óleo essencial. Os cromatogramas de íons totais (TIC) (Figura 23) mostram os picos cujos compostos voláteis correspondentes são apresentados na Tabela 14.

Figura 24 - Cromatograma total de íons para os compostos voláteis do óleo essencial de araçá e dos compostos voláteis capturados pela coluna de Porapak-Q®.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Dezesseis picos cromatográficos foram identificados entre os voláteis capturados pelo Porapak-Q® durante as duas primeiras horas de extração. A identificação dos compostos foi feita por comparação do espectro de massa dos picos cromatográficos com aqueles da biblioteca NIST 11 e 11s do equipamento de GC-MS. Além disso, o índice de retenção aritmético (AI) foi calculado para todos os compostos usando uma série homóloga de n-alcanos sob as mesmas condições operacionais. Os compostos majoritários identificados foram α -pinene (20,75%), p-cymene (20,50%) e o-cymene (20,05%).

Doze picos cromatográficos foram identificados como os compostos voláteis do óleo essencial de araçá. Quatro deles também foram encontrados nos compostos eluídos da armadilha de Porapak-Q® porém em diferentes proporções. Os compostos com maior tempo de retenção foram encontrados exclusivamente no óleo essencial e aqueles com menor tempo de retenção foram encontrados apenas entre os compostos eluídos da armadilha de Porapak-Q®. Os voláteis majoritários encontrados no óleo essencial, em ordem decrescente, foram E-cariofileno (17,56%), α -humuleno (16,26%) e β -sesquifelandreno (14,27%), que são constituintes voláteis de outros diversos óleos essenciais tais como óleo essencial de *Cordia*

verbenácea (FERNANDES et al., 2007), óleo essencial de *Croton flavens* L. (SYLVESTRE et al., 2006), óleo essencial de *Eugenia caryophyllata* (CHAIEB et al., 2007), óleo essencial de *Teucrium marum* (RICCI et al., 2005) e óleo essencial de *Zingiber officinale* (EL-BAROTY et al., 2010).

O E-cariofileno está relacionado com ação antidepressiva, anticâncer e analgésica (KLAUKE et al., 2014; BAHÍ et al., 2014). O composto α -humuleno apresenta ação anticâncerígena (LEGAULT e PICHETTE, 2007), analgésica e anti-inflamatória (FERNANDES et al., 2007). O terceiro composto majoritário identificado no óleo essencial de *Psidium grandifolium* Mart. ex DC., β -sesquifelandreno, também é reportado como um composto anticancerígeno, apresentando efeitos antiproliferativos contra leucemia, células cancerosas colorretais e contra células de mieloma múltiplo (TYAGI et al., 2015).

Alguns dos compostos identificados neste trabalho (α -pineno, β -mmirceno, E-cariofileno e β -himachaleno) também foram identificados por Pino, Marbot e Vázquez (2001) que isolaram os compostos voláteis da polpa de *Psidium cattleianum* Sabine obtido via destilação simultânea a vapor e extração com solvente orgânico. Nenhum dos compostos identificados correspondem àqueles identificados por Egea et al. (2014); estes autores também obtiveram os voláteis a partir da polpa do fruto de araçá por um sistema de captura de voláteis composto por uma fase sólida contendo polipropileno padrão e resina LiChrolut EN e os identificaram por cromatógrafo gasoso acoplado a olfatômetro.

Esta diferença nos compostos voláteis encontrados pelos diferentes autores se deve, provavelmente, ao fato de os frutos serem de espécies diferentes, terem sido cultivados em solos diferentes já que são provenientes de diferentes localizações geográficas (Pirassununga e Curitiba/BR e Havana/CU) o que implica em diferentes condições climáticas além de diferentes épocas de colheita. Mas, tão relevante quanto a procedência é o preparo da amostra e o processo de extração empregado. Neste experimento foi usado o fruto como um todo, incluindo a casca, e nas referências citadas foram analisados apenas os voláteis presentes na polpa do fruto. O processo de obtenção dos extratos também foram diferentes, pois neste experimento empregou-se tecnologia verde com emprego de extração com fluido supercrítico (SFE) ao invés de solventes orgânicos.

Tabela 14 - Perfil de voláteis de araquá

Pico	Componente	Fórmula molecular	Peso molecular	Número CAS	Similaridade com a NIST (%)	TR	IA*	IA	A (%)
Compostos voláteis capturados pela coluna de Porapak-Q®									
1	α -pinene	C ₁₀ H ₁₆	136.2340	80-56-8	96	5.11	932	929.32	20.75
2	β -pinene	C ₁₀ H ₁₆	136.2340	127-91-3	97	6.52	974	972.84	10.35
3	β -myrcene	C ₁₀ H ₁₆	136.2340	123-35-3	95	7.08	988	990.12	1.84
4	p-cymene	C ₁₀ H ₁₄	134.2182	99-87-6	86	9.85	1020	1043.52	20.50
5	o-cymene	C ₁₀ H ₁₄	134.2182	527-84-4	88	10.17	1022	1049.20	20.05
6	p-Ethyl Acetophenone	C ₁₀ H ₁₂ O	148.2017	937-30-4	94	25.50	1279	1262.34	4.12
7	p-Ethyl Acetophenone	C ₁₀ H ₁₂ O	148.2017	937-30-4	95	26.64	1279	1278.79	4.11
8	α -copaene	C ₁₅ H ₂₄	204.3511	3856-25-5	95	31.91	1374	1371.29	4.02
9	E-caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	204.3511	87-44-5	97	34.00	1417	1412.28	8.29
10	aromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	204.3511	109119-91-7	94	34.93	1439	1432.68	1.34
11	α -humulene	C ₁₅ H ₂₄	204.3511	6753-98-6	96	35.61	1452	1447.59	4.63
Compostos voláteis presentes no óleo essencial									
1	α -copaene	C ₁₅ H ₂₄	204.3511	3856-25-5	94	31.91	1374	1371.29	4.01
2	E-caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	204.3511	87-44-5	96	34.00	1417	1412.28	17.56
3	aromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	204.3511	109119-91-7	93	34.93	1439	1432.68	4.24
4	α -humulene	C ₁₅ H ₂₄	204.3511	6753-98-6	95	35.61	1452	1447.59	16.26
5	β -acoradiene	C ₁₅ H ₂₄	204.3511	24048-44-0	82	36.97	1469	1477.41	2.37
6	γ -gurjunene	C ₁₅ H ₂₄	204.3511	22567-17-5	85	37.11	1475	1480.48	3.09
7	β -chamigrene	C ₁₅ H ₂₄	204.3511	18431-82-8	91	37.52	1476	1489.47	3.24
8	cis- α -bisabolene	C ₁₅ H ₂₄	204.3511	70332-15-9	88	38.28	1506	1506.85	12.79
9	β -himachalene	C ₁₅ H ₂₄	204.3511	1461-03-6	89	38.42	1500	1510.27	10.70
10	β -sesquiphellandrene	C ₁₅ H ₂₄	204.3511	20307-83-9	91	38.89	1521	1521.76	14.27
11	germacrene B	C ₁₅ H ₂₄	204.3511	15423-57-1	84	39.24	1454	1530.32	5.62
12	β -bisabolol	C ₁₅ H ₂₆ O	222.3663	15352-77-9	93	44.70	1674	1638.44	5.86

TR = tempo de retenção experimental (min); IA* = índice de retenção aritmético teórico; IA = índice de retenção aritmético experimental; A = área do pico (%); *Fonte: Adams, 2009.

Fonte: Própria autoria, 2018.

5.9 Compostos fenólicos

A curva padrão de ácido gálico foi construída usando soluções de ácido gálico diluído em metanol (Figura 24). Aplicando um ajuste linear à curva padrão construída obteve-se a Equação 6 com um coeficiente de regressão de 0,999, que foi utilizada para calcular o teor total de fenólicos expressos em miligramas de equivalente em ácido gálico (EGA) para cada 100 g de massa seca do fruto (mg EGA/100 g massa seca).

$$EGA = 0,0107x + 0,084 \quad (6)$$

em que x é a absorbância mensurada em espectrofotômetro.

Figura 25 - Curva-padrão para o ácido gálico.

Fonte: Própria autoria, 2018.

O teor de compostos fenólicos (TCF) nos extratos foi obtido correlacionando a absorbância no comprimento de onda de 760 nm da solução após a reação de oxido-redução para cada extrato etanólico de araçá obtido em cada ensaio do DCCR, os valores obtidos estão expressos na Tabela 15.

Analisando os dados apresentados na Tabela 15, foi possível inferir que o extrato com maior teor de compostos fenólicos foi aquele extraído sob as condições do ensaio 8, na qual a

aplicou-se temperatura intermediária e tempo estático elevado. Observa-se também que o menor teor de compostos fenólicos foi medido no extrato obtido pelo ensaio 1, no qual aplicou-se temperatura mais baixa (50 °C) e curto tempo de contato. A partir deste resultado, pode-se supor que nestas condições, alguns compostos deixaram de ser extraídos já que também não apresentou atividade antimicrobiana contra uma das bactérias testadas ao ser comparado aos demais extratos (Tabela 13). Takao, Imatomi e Gualtieri quantificaram TCF em infusão da folha de *Psidium cinereum* Mart. obtendo $324,72 \pm 3,28$ mg EGA/100 de extrato seco.

Tabela 15 - Teor de compostos fenólicos (TCF) nos extratos etanólicos de araçá.

Ensaio	Variáveis reais		TCF (mg EGA/100 g massa seca)
	T (°C)	St (min)	
1	50	4	25,84
2	70	4	93,17
3	50	8	123,72
4	70	8	94,18
5	46	6	56,18
6	74	6	124,80
7	60	3	91,45
8	60	9	136,95
9	60	6	94,81
10	60	6	92,06
11	60	6	103,57

Fonte: Própria autoria, 2018.

A fim de saber se as variáveis de processo estudadas, a temperatura e o tempo estático, influenciaram o TCF, avaliaram-se os efeitos principais por meio de análise de variância (ANOVA). Com base no diagrama de pareto (Figura 25) pode-se inferir que a temperatura (T) não influencia significativamente no TCF dos extratos etanólicos de araçá e que o tempo estático (St) e a interação entre ambas as variáveis ($T \times St$) influenciam significativamente sobre esta variável dependente ao nível de 95% de significância.

A ANOVA para modelos de primeira e segunda ordem, apresentada na Tabela 16, mostrou que, para ambos os modelos, pelo menos uma das variáveis teve efeito significativo sobre o TCF com nível de significância de 95%, pois em ambos os casos $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$.

Os coeficientes de regressão calculados (R^2) de 0,94 para o modelo de primeira ordem e 0,87 para o modelo de segunda ordem sugerem que o modelo linear é o que descreve melhor a influência dessas variáveis sobre a TCF nos extratos etanólicos de araçá.

Figura 26 - Diagrama de Pareto da influência das variáveis T (x_1) e St (x_2) e da interação TxSt ($x_1 \cdot x_2$) sobre o teor de compostos fenólicos.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Tabela 16 - Análise de variância (ANOVA) para os modelos de primeira e segunda ordem para TCF dos extratos etanólicos de arará (Erro residual).

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calculado}	F _{tabelado}
Modelo de primeira ordem					
Regressão	5147,8	3	1715,9		
Resíduo	343,8	3	114,6	15,0	9,28
Total	5491,6	6	-		
Modelo de segunda ordem					
Regressão	8538,5	5	1707,7		
Resíduo	1316,8	5	263,4	6,5	5,05
Total	9855,3	10	-		

F_{calculado} maior que o F_{tabelado} ao nível de 95% de confiança.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Conforme verificado na ANOVA, os modelos matemáticos de primeira (Equação 7) e segunda ordem (Equação 8) se adequam aos dados experimentais e descrevem o efeito das variáveis independentes estudadas e da interação entre elas ($T \times St$) no TCF, em mg EGA/100 g de massa seca. Os coeficientes significativos estão assinalados com (*) em ambas as equações.

$$y = 89,62^* + 9,45 T + 24,72 St^* - 24,22 TxSt^* \quad (7)$$

$$y = 96,81^* + 16,85T^* - 7,69T^2 + 20,40St^* + 4,16St^2 - 24,22TxSt^* \quad (8)$$

As Figuras 26 e 27 mostram o ajuste dos valores experimentais em relação aos valores preditos nos modelos de primeira e segunda ordem, respectivamente. A análise das figuras corrobora com a informação de que os modelos propostos se ajustaram bem aos dados experimentais e também pode-se verificar visualmente que o modelo de primeira ordem é o que apresenta maior ajuste aos dados experimentais.

Figura 27 - Diagrama de valores experimentais versus valores preditos pelo modelo de primeira ordem para TCF

Fonte: Própria autoria, 2018.

Figura 28 - Diagrama de valores experimentais versus valores preditos pelo modelo de segunda ordem para TCF

Fonte: Própria autoria, 2018.

A influência da temperatura (T), do tempo estático (St) e da interação entre essas variáveis independentes ($T \times St$) no TCF também pode ser observada através da análise de superfície de resposta (ASR).

Ao analisar a superfície de resposta do modelo de primeira ordem (Figura 28), pode-se inferir que existe uma região otimizada indicando que maiores TCF nos extratos de araçá são obtidos quando se aplica temperatura mais baixa e maior tempo de contato em cada ciclo.

Figura 29 - Superfície de resposta gerada pelo modelo de primeira ordem que descreve os efeitos das variáveis independentes no TCF.

Fonte: Própria autoria, 2018.

6. *Conclusão*

Neste estudo aplicaram-se tecnologias emergentes com o intuito de obter dois novos produtos para aplicações diversas, utilizando processos limpos que geram pouco impacto no meio ambiente e ainda estimular a preservação de espécies da Mata Atlântica brasileira.

A proposta de empregar dois processos consecutivos de extração teve o intuito de demonstrar técnicas de processo que possibilitem um maior aproveitamento da matéria-prima com melhor e maior extração de seus compostos bioativos e se mostrou bastante relevante já que, com isso obteve-se dois extratos com diferentes constituições, um rico em compostos apolares e outro rico em compostos polares.

Com o óleo essencial de arazá obtido via SFE esperava-se obter um extrato vegetal que tivesse uma alta atividade antimicrobiana comum à família *Myrtaceae* porém tal hipótese não se sustentou neste estudo. No entanto, verificou-se que o perfil aromático do arazá é composto pela interação de diversos compostos voláteis, dos quais foram destacados neste trabalho aqueles encontrados em maior quantidade, ou seja, os mais representativos. Estes voláteis podem promover benefícios à saúde como, por exemplo, ação anticancerígena pois todos os 3 principais compostos identificados possuem esta ação reportada na literatura científica, além do efeito antimicrobiano contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* conforme demonstrado neste trabalho.

Com a extração com etanol pressurizado buscou-se obter extratos etanólicos ricos em compostos fenólicos que são excelentes antioxidantes naturais, o que foi sustentado por este estudo além destes extratos terem se mostrado excelentes agentes antimicrobianos.

Referências

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4^a ed. Carol Stream: Allured books, 2009, 804 p.

ADRIAN, J. A. L. et al. Proximate analysis, in vitro organic matter digestibility, and energy content of common Guava (*Psidium guajava* L.) and yellow, strawberry Guava (*Psidium cattleianum* Var. *lucidum*) tree parts and fruits as potential forage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 60, n. 42, p. 10398-10405, 2012.

AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.

ALVARENGA, F. Q. et al. In vivo analgesic activity, toxicity and phytochemical screening of the hydroalcoholic extract from the leaves of *Psidium cattleianum* Sabine. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 150, n. 1, p. 280-284, 2013.

ALVES, E. G. et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

ANDRADE, C. A. et al. Antioxidant and antibacterial activity of extracts, fractions and isolated substances from the flowers of *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 715-722, 2010.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 18 ed., Gaithersburg: AOAC International, 2005.

APEL, M. A. et al. Screening of the biological activity from essential oils of native species from the Atlantic rain forest (São Paulo–Brazil). **Pharmacology online**, Philadelphia, v. 3, p. 376-383, 2006.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa: Editora UFV, 2006.

ARCEUSZ, A.; WESOŁOWSKI, M.; KONIECZYNSKI, P. Methods for extraction and determination of phenolic acids in medicinal plants: a review. **Natural product communications**, Westerville, v. 8, n. 12, p. 1821-1829, 2013.

ARIMA, H.; DANNO, G. Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, Abingdon, v. 66, n. 8, p. 1727-1730, 2002.

AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **Journal of Food Engineering**, London, v. 117, n. 4, p. 426-436, 2013.

BAHI, A. et al. β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. **Physiology & Behavior**, Philadelphia, v. 135, p. 119-124, 2014.

- BAIANO, A.; DEL NOBILE, M. A. Antioxidant compounds from vegetable matrices: Biosynthesis, occurrence, and extraction systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, New York, v. 56, n. 12, p. 2053-2068, 2016.
- BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. (Eds). **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2010, 948 p.
- BELANDRIA, V. et al. Pressurized-fluid extraction of cafestol and kahweol diterpenes from green coffee. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 37, p. 145-152, 2016.
- BERNHOF, A. et al. Bioactive compounds in plants—benefits and risks for man and animals. **The Norwegian Academy of Science and Letters**, Oslo, 2010.
- BIEGELMEYER, R. et al. Comparative analysis of the chemical composition and antioxidant activity of red (*Psidium cattleianum*) and yellow (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) strawberry guava fruit. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 76, n. 7, 2011.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRAVI, E. et al. Supercritical fluid extraction for quality control in beer industry. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 42, n. 3, p. 342-346, 2007.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, Cary, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.
- BREWER, M. S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 10, n. 4, p. 221-247, 2011.
- BRIGHENTI, F. L. et al. Effect of *Psidium cattleianum* leaf extract on *Streptococcus mutans* viability, protein expression and acid production. **Caries Research**, Basel, v. 42, n. 2, p. 148-154, 2008.
- BRITO, M. V. H. et al. Copaiba oil effect on urea and creatinine serum levels in rats submitted to kidney ischemia and reperfusion syndrome. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 243-246, 2005.
- CARABIAS-MARTÍNEZ, R. et al. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1089, n. 1-2, p. 1-17, 2005..
- CASTRO, M. R. et al. Essential oil of *Psidium cattleianum* leaves: Antioxidant and antifungal activity. **Pharmaceutical Biology**, Abingdon, v. 53, n. 2, p. 242-250, 2015.
- CASTRO-PUYANA, M. et al. Optimization of clean extraction methods to isolate carotenoids from the microalga *Neochloris oleoabundans* and subsequent chemical

characterization using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 405, n. 13, p. 4607-4616, 2013.

CHAIIEB, K. et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. **Phytotherapy Research**, Oxford, v. 21, n. 6, p. 501-506, 2007.

CHUA, L. S. et al. Flavonoids and phenolic acids from *Labisia pumila* (Kacip Fatimah). **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 127, n. 3, p. 1186-1192, 2011.

CIDADE-BRASIL. Município de Pirassununga. Disponível em: <<http://www.cidade-brasil.com.br/municipio-pirassununga.html>>. Acesso em 08 ago. 2016.

CLIFFORD, A.A. Introduction to supercritical fluid extraction in analytical science. In *Supercritical Fluid Extraction and Its Use in Chromatographic Sample Preparation*; Westwood, S.A. ed.; **CRC Press**, Boca Raton, Florida, 1–39, 1993.

CORNELIO-SANTIAGO, H. P. **Medida de solubilidade de óleo de café verde (*coffea arábica* L.) em dióxido de carbono supercrítico e modelagem termodinâmica**. 2015. 91 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

COSTELLO, R. B. et al. Perspective: The Case for an Evidence-Based Reference Interval for Serum Magnesium: The Time Has Come–5. **Advances in Nutrition**, New York, v. 7, n. 6, p. 977-993, 2016.

CUSHNIE, T. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.

DENARDIN, C. C. et al. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, Philadelphia, v. 23, n. 3, p. 387-398, 2015.

DOGENSKI, M.; FERREIRA, N. J.; OLIVEIRA, A. L. Extraction of *Corymbia citriodora* essential oil and resin using near and supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 115, p. 54-64, 2016.

DREHMER, A. M. F.; AMARANTE, C. V. T. Post harvest preservation of red strawberry-guavas as affected by maturity stage and storage temperature. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 322-326, 2008.

DUFRESNE, C. J.; FARNWORTH, E. R. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 12, n. 7, p. 404-421, 2001.

EGEA, M. B. et al. Comparative analysis of aroma compounds and sensorial features of strawberry and lemon guavas (*Psidium cattleianum* Sabine). **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 164, p. 272-277, 2014.

- EHLERS, D. et al. Analysis of essential basil oils-CO₂ extracts and steam-distilled oils. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, Hamburg, v. 97, n. 7, p. 245-250, 2001.
- EIKANI, M. H.; GOLMOHAMMAD, F.; ROWSHANZAMIR, S Subcritical water extraction of essential oils from coriander seeds (*Coriandrum sativum* L.). **Journal of Food Engineering**, London, v. 80, n. 2, p. 735-740, 2007.
- EL-BAROTY, G. S. et al. Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils. **African Journal of Biochemistry Research**, Lagos Nigeria, v. 4, n. 6, p. 167-174, 2010.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISAS AGROPECUÁRIAS (EMBRAPA). Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Árvore do conhecimento: Tecnologia de Alimentos. **Sensorial**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000fid46tch02wyiv80z4s473kkywngf.html>. Acesso em: 10/12/2016.
- ESCARPA, A.; GONZALEZ, M. C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, New York, v. 31, n. 2, p. 57-139, 2001.
- FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols—a review. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 21, n. 10, p. 510-523, 2010.
- FERNANDES, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (–)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 569, n. 3, p. 228-236, 2007.
- FIASCHI, P.; PIRANI, J. R. Review of plant biogeographic studies in Brazil. **Journal of Systematics and Evolution**, Hoboken, v. 47, n. 5, p. 477-496, 2009.
- GALHO, A. S. et al. Composição Química e respiratório de crescimento em frutos de *Psidium cattleyanum* sabine durante o ciclo de desenvolvimento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 61-66, 2007.
- GARCIA-SALAS, P. et al. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 12, p. 8813-8826, 2010.
- GENG, Y. et al. An efficient method for extraction, separation and purification of eugenol from *Eugenia caryophyllata* by supercritical fluid extraction and high-speed counter-current chromatography. **Separation and Purification Technology**, Oxford, v. 57, n. 2, p. 237-241, 2007.
- GNAN, S. O.; DEMELLO, M. T. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by aqueous Goiaba extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 68, n. 1-3, p. 103-108, 1999.
- GORDON, A. et al. Phenolic constituents and antioxidant capacity of four underutilized fruits from the Amazon region. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 14, p. 7688-7699, 2011.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, Kidlington, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

GUTIÉRREZ, R. M. P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R. V. Psidium guajava: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 117, n. 1, p. 1-27, 2008.

HAMINIUK, C. W. I. et al. Influence of temperature on the rheological behavior of whole araçá pulp (Psidium cattleianum sabine). **LWT-Food Science and Technology**, London, v. 39, n. 4, p. 427-431, 2006.

HE, F. J.; MACGREGOR, G. A. Beneficial effects of potassium on human health. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 133, n. 4, p. 725-735, 2008.

HERNÁNDEZ, Y.; LOBO, M. G.; GONZÁLEZ, M. Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 114, n. 2, p. 734-741, 2009.

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

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HSU, C.; YEN, G. Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v. 52, n. 1, p. 53-61, 2008.

IM, I. et al. The butanol fraction of guava (Psidium cattleianum Sabine) leaf extract suppresses MMP-2 and MMP-9 expression and activity through the suppression of the ERK1/2 MAPK signaling pathway. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v. 64, n. 2, p. 255-266, 2012.

JACOB, J. K. et al. Biochemical basis for functional ingredient design from fruits. **Annual Review of Food Science and Technology**, Palo Alto, v. 3, p. 79-104, 2012.

JAIARJ, P. et al. Anticough and antimicrobial activities of Psidium guajava Linn. leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 67, n. 2, p. 203-212, 1999.

JAYAPRAKASHA, G. K. et al. Novel triterpenoid from Citrus aurantium L. possesses chemopreventive properties against human colon cancer cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Kidlington, v. 16, n. 11, p. 5939-5951, 2008.

JIMENEZ-CARMONA, M. M.; UBERA, J. L.; DE CASTRO, M. D. L. Comparison of continuous subcritical water extraction and hydrodistillation of marjoram essential oil. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 855, n. 2, p. 625-632, 1999.

- JUN, N. J. et al. Cytotoxic Activity of [β]-Caryophyllene Oxide Isolated from Jeju Guava (*Psidium cattleianum* Sabine) Leaf. **Records of Natural Products**, Gebze-Kocaeli, v. 5, n. 3, p. 242, 2011.
- KALT, Wilhelmina. Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 70, n. 1, p. 11-19, 2005.
- KANG, K. S. et al. Beneficial effects of natural phenolics on levodopa methylation and oxidative neurodegeneration. **Brain Research**, Amsterdam, v. 1497, p. 1-14, 2013.
- KARALE CHANDRAKANT, K. et al. An overview on supercritical fluid extraction for herbal drugs. **Pharmacology Online**, Philadelphia, v. 2, p. 575-596, 2011.
- KARIMI, E.; JAAFAR, H. Z.; AHMAD, S. Antifungal, anti-inflammatory and cytotoxicity activities of three varieties of *labisia pumila* benth: from microwave obtained extracts. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 13, n. 1, p. 20, 2013.
- KAUFMANN, B.; CHRISTEN, P. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. **Phytochemical Analysis**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 105-113, 2002.
- KIM, J.; KIM, J.; PARK, E. Antioxidative and antigenotoxic effects of onion peel extracts in non-cellular and cellular systems. **Food Science and Biotechnology**, Seoul, v. 22, n. 5, p. 1-8, 2013.
- KLAUKE, A. L. et al. The cannabinoid CB2 receptor-selective phytocannabinoid β -caryophyllene exerts analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology**, Amsterdam, v. 24, n. 4, p. 608-620, 2014.
- LANDRUM, L. R. A revision of the *Psidium salutare* complex (Myrtaceae). **SIDA, Contributions to Botany**, Fort Worth, v. 20, p. 1449-1469, 2003.
- LAROZE, L.; ZÚÑIGA, M. E.; SOTO, C. Raspberry phenolic antioxidants extraction. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 136, p. 717-742, 2008.
- LEE, K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant activities of volatile components isolated from *Eucalyptus* species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 81, n. 15, p. 1573-1579, 2001.
- LEGAULT, J.; PICHETTE, A. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Oxford, v. 59, n. 12, p. 1643-1647, 2007.
- LEWINGTON, A. Medicinal plants and plant extracts: A review of their importation into Europe. **Traffic International**, Cambridge, 1993.
- LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 64, p. 4-17, 2012.

- LOZOYA, X. et al. Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of a spasmolytic principle. **Archives of Medical Research**, Philadelphia, v. 25, n. 1, p. 11-15, 1994.
- LUCAS, E. J. et al. Phylogenetic patterns in the fleshy-fruited Myrtaceae—preliminary molecular evidence. **Plant Systematics and Evolution**, Wien, v. 251, n. 1, p. 35-51, 2005.
- LUXIMON-RAMMA, A.; BAHORUN, T.; CROZIER, A. Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 83, n. 5, p. 496-502, 2003.
- MANNHEIMER, W. A. **Microscopia dos Materiais: Uma introdução**. Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise. Editora E-papers, Rio de Janeiro, 2002.
- MARIN, R. et al. Volatile componentes and antioxidante activity from some Myrtaceous fruits cultivated in Southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**, La Plata, v. 27, p. 172-177, 2008
- MARQUES, F. A. et al. Volatile oil of *Psidium cattleianum* Sabine from the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Essential Oil Research**, New York, v. 20, n. 6, p. 519-520, 2008.
- MARTIROSYAN, D. M. Functional foods and chronic diseases: science and practice. **Dallas: Food Science Publisher**, p. 1-287, 2011.
- MCCOOK-RUSSELL, K. P. et al. Nutritional and nutraceutical comparison of Jamaican *Psidium cattleianum* (strawberry guava) and *Psidium guajava* (common guava) fruits. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 134, n. 2, p. 1069-1073, 2012.
- MCSWEENEY, C. S. et al. Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 90, n. 1, p. 78-88, 2001.
- MEDINA, A. L. et al. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 128, n. 4, p. 916-922, 2011.
- MENEZES, T. E. C. et al. Protective efficacy of *Psidium cattleianum* and *Myracrodruon urundeuva* aqueous extracts against caries development in rats. **Pharmaceutical Biology**, Abingdon, v. 48, n. 3, p. 300-305, 2010.
- MIGLIACCIO, S.; ANDERSON, J. J. B. Isoflavones and skeletal health: are these molecules ready for clinical application?. **Osteoporosis International**, London, v. 14, n. 5, p. 361-368, 2003.
- MOHAMMAD AZMIN, S. N. H. et al. Herbal processing and extraction technologies. **Separation and Purification Reviews**, New York, v. 45, n. 4, p. 305-320, 2016.

MONTEDORO, G.; SERVILI, M.; BALDIOLI, M.; MINIATI, E. Simple and hydrolyzable in virgin olive oil. Their extraction, separation and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, p. 1571–1576, 1992.

MOON, J. Y. et al. The chloroform fraction of guava (*Psidium cattleianum* Sabine) leaf extract inhibits human gastric cancer cell proliferation via induction of apoptosis. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 125, n. 2, p. 369-375, 2011.

MUKHOPADHYAY, M. **Natural Extracts Using Supercritical Carbon Dioxide**. CRC Press, Boca Raton, Florida. 339 p. 2000.

MUSTAFA, A; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 703, n. 1, p. 8-18, 2011.

NUNN, J. F. Ancient Egyptian Medicine. Oklahoma City: **University of Oklahoma Press/Red River Books**, 2002.

OLIVEIRA, A. L.; KAMIMURA, E. S.; RABI, J. A. Response surface analysis of extract yield and flavour intensity of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) obtained by supercritical carbon dioxide extraction. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 10, n. 2, p. 189-194, 2009.

OLIVEIRA, A. L. et al. Isolation by pressurised fluid extraction (PFE) and identification using CPC and HPLC/ESI/MS of phenolic compounds from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.). **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 145, p. 522-529, 2014.

ONG, E. S.; CHEONG, J. S. H.; GOH, D. Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1112, n. 1-2, p. 92-102, 2006.

OZEN, T.; DEMIRTAS, I.; AKSIT, H. Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 124, n. 1, p. 58-64, 2011.

PATEL, S. Exotic tropical plant *Psidium cattleianum*: a review on prospects and threats. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, Dordrecht, v. 11, n. 3, p. 243-248, 2012.

PEREIRA, M. C. et al. Characterization and antioxidant potential of Brazilian fruits from the Myrtaceae family. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 60, n. 12, p. 3061-3067, 2012.

PINO, J. A. et al. Leaf oils of *Psidium parvifolium* Griseb. and *Psidium cattleianum* Sabine from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, New York, v. 16, n. 4, p. 370-371, 2004.

PINO, J. A.; MARBOT, R.; VÁZQUEZ, C. Characterization of volatiles in strawberry guava (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 12, p. 5883-5887, 2001.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, p. 45-61, 2002.

RASEIRA, M. C. B.; RASEIRA, A. **Contribuição ao estudo do araçazeiro, *Psidium cattleianum***. EMBRAPA-CPACT, 1996.

RBMA, **Reserva da Biosfera da Mata Atlântica**. Anuário da Mata Atlântica. Disponível em: www.rbma.org.br/anuariomataatlantica/mata_atlantica.php

RICCI, D. et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 98, n. 1-2, p. 195-200, 2005.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, New York, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SAINI, R. K.; KEUM, Y. Tocopherols and tocotrienols in plants and their products: A review on methods of extraction, chromatographic separation, and detection. **Food Research International**, Kidlington, v. 82, p. 59-70, 2016.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: estructura y clasificación. Presencia en alimentos y consumo. Biodisponibilidad y metabolismo. **Alimentaria**, Mexico City, n. 329, p. 19-27, 2002.

SANTOS, D. N. et al. Arginase inhibition, antibacterial and antioxidant activities of Pitanga seed (*Eugenia uniflora* L.) extracts from sustainable technologies of high pressure extraction. **Food Bioscience**, Amsterdam, v. 12, p. 93-99, 2015.

SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. **Journal of Food Engineering**, London, v. 108, n. 3, p. 444-452, 2012.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, New York, v. 130, n.8, p. 2073-2085, 2000.

SCHMIDT, E. M. et al. Effect of extraction solvent on antiradical activity of the obtained propolis extracts. **Journal of Apicultural Research**, Abingdon, v. 53, n. 1, p. 91-100, 2014.

SCUR, M. C. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 76, n. 1, p. 101-108, 2016.

SHERIDAN, K.; LOGOMARSINO, J. V. Effects of serum phosphorus on vascular calcification in a healthy, adult population: A systematic review. **Journal of Vascular Nursing**, Philadelphia, v. 35, n. 3, p. 157-169, 2017.

SILVA, B. V.; BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. B. P. Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and

protected-delivery technologies. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 50, p. 144-158, 2016.

SILVA, N. A. et al. Phenolic compounds and carotenoids from four fruits native from the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 62, n. 22, p. 5072-5084, 2014.

SILVA, S.; TASSARA, H. **Fruit in Brazil**. Empresa das Artes, 1998.

SIM, C. C.; KUMARESAN, S.; SARMIDI, M. R. Mass transfer coefficients of *Eurycoma longifolia* batch extraction process. In: **Proc. 18th Symposium of Malaysian Chemical Engineers**. 2004. p. 362-367.

SIMÕES, C. M. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2003. 15. Farmacopéia Brasileira, Formulário Nacional, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2005.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SOUZA, G. C. et al. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 90, n. 1, p. 135-143, 2004.

SOUZA, J. N. S. et al. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: a correlation study using chemical and biological in vitro assays. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 106, n. 1, p. 331-339, 2008.

SRINIVAS, K.; KING, J. W. Supercritical carbon dioxide and subcritical water: Complementary agents in the processing of functional foods. **Functional Food Product Development**, p. 39-78, 2010.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 30, n. 18, p. 3268-3295, 2007.

STANKOVIĆ, S.; KIRALJ, R. Inorganic Sulphur Compounds in the Human Body. I. Oxo Compounds. **Kemija u industriji: časopis kemičara i tehnologa Hrvatske**, Zagreb, v. 66, n. 11-12, p. 617, 2017.

SUKONTASON, K. L. et al. Effects of eucalyptol on house fly (Diptera: Muscidae) and blow fly (Diptera: Calliphoridae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 46, n. 2, p. 97-101, 2004.

SYLVESTRE, M. et al. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 103, n. 1, p. 99-102, 2006.

TADINI, C.; TELIS, V. R. N.; MEIRELLES, A. J. A. **Operações Unitárias na Indústria de Alimentos**. Grupo Gen-LTC, 2016.

TAGURI, T.; TANAKA, T.; KOUNO, I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 27, n. 12, p. 1965-1969, 2004.

TAKAO, L. K.; IMATOMI, M.; GUALTIERI, S. C. J. Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 75, n. 4, p. 948-952, 2015.

TEPE, B. et al. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 84, n. 4, p. 519-525, 2004.

TONA, L. et al. Biological screening of traditional preparations from some medicinal plants used as antidiarrhoeal in Kinshasa, Congo. **Phytomedicine**, Muenchen, v. 6, n. 1, p. 59-66, 1999.

TRIPATHI, A. K. et al. Toxicity, feeding deterrence, and effect of activity of 1, 8-cineole from *Artemisia annua* on progeny production of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Economic Entomology**, Cary, v. 94, n. 4, p. 979-983, 2001.

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 812, n. 1-2, p. 85-99, 2004.

TYAGI, A. K. et al. Identification of a novel compound (β -sesquiphellandrene) from turmeric (*Curcuma longa*) with anticancer potential: comparison with curcumin. **Investigational New Drugs**, New York, v. 33, n. 6, p. 1175-1186, 2015.

VELIOGLU, Y. S. et al. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 10, p. 4113-4117, 1998.

VORAVUTHIKUNCHAI, S. et al. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 94, n. 1, p. 49-54, 2004.

VRIESMANN, L. C. et al. Acidic polysaccharides from *Psidium cattleianum* (Araçá). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 2, p. 259-264, 2009.

WEAVER, C. M. et al. Calcium, dairy products, and energy balance in overweight adolescents: a controlled trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 94, n. 5, p. 1163-1170, 2011.

WEI, H. et al. Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 50, n. 3, p. 499-502, 1990.

WILSON, P. G. et al. Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 88, n. 11, p. 2013-2025, 2001.

World Health Organization: WHO traditional Medicine Strategy 2002-2005. Geneva, WHO 2002

YAMAMOTO, Y.; GAYNOR, R. B. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 107, n. 2, p. 135-142, 2001.