



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

LAÍS FERREIRA OTON

**EXTRAÇÃO VERDE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA FOLHA DA
GRAVIOLEIRA: APLICAÇÃO DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS.**

FORTALEZA

2025

LAÍS FERREIRA OTON

EXTRAÇÃO VERDE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA FOLHA DA GRAVIOLEIRA:
APLICAÇÃO DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutorado em Engenharia Química. Área de concentração: Processos bioquímicos.

Orientadora: Profa. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar.

Coorientador: Prof. Dr. Edy Sousa de Brito.

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Oton, Lais Ferreira.

Extração verde de compostos bioativos da folha da gravioleira: Aplicação de solventes eutéticos profundos. / Lais Ferreira Oton. – 2025.
109 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2025.

Orientação: Profa. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar.

Coorientação: Prof. Dr. Edy Sousa de Brito.

1. *Annona muricata* Lin. 2. otimização de extração. 3. compostos bioativos. 4. solventes eutéticos profundos. 5. atividade citotóxica. I. Título.

CDD 660

LAÍS FERREIRA OTON

EXTRAÇÃO VERDE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA FOLHA DA GRAVIOLEIRA:
APLICAÇÃO DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutorado em Engenharia Química. Área de concentração: Processos bioquímicos.

Aprovada em: 10/06/2025

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar. (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Sara Isabel da Cruz Silvério
Universidade do Minho (UMINHO)

Profa. Dra. Fábila Karine Andrade
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Profa. Dra. Tigressa Helena Soares Rodrigues
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

A Deus.

Aos meus pais, Jucilene Oton e Claudenido
Oton.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao Senhor meu Deus, por Sua infinita misericórdia, graça e bondade que têm sido a força e a luz em minha vida. Sou grata por Sua presença constante, por me guiar e me sustentar, por ser meu refúgio, minha rocha e minha proteção em todos os momentos. A Ele, que sempre me ouviu, que nunca me deixou só e que, com Sua generosidade, me permitiu alcançar meus objetivos nesta jornada, sejam dadas toda honra, glória e louvor. Meu coração transborda de gratidão, pois, em Sua fidelidade e amor, tenho vivido os maiores milagres.

Agradeço profundamente à minha família: minha mãe, Maria Jucilene Oton, meu pai, Claudenildo Oton, e meu irmão, Levi Oton, por todo o carinho, cuidado e apoio incondicional ao longo desta jornada. Vocês foram sempre meus companheiros e cúmplices. Sou imensamente grata por essa família que me deu todo o suporte que precisei, que me acolheu nos momentos difíceis e sorriu comigo nas vitórias. Não consigo expressar em palavras o quanto sou grata pela sinceridade, pelo amor e pela dedicação de cada um de vocês. Cada gesto de apoio e carinho foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

Minha gratidão também se estende aos irmãos da igreja de Jesus, tanto aos que residem em Caucaia, Fortaleza e Salvador, no Brasil, quanto aos meus novos e queridos irmãos que vivem em Lisboa, Porto e Braga, em Portugal. Agradeço por todas as orações e pelo apoio que recebi dessa família que o Senhor me deu.

À Prof.^a Dra. Rílvia Saraiva, expresso minha profunda gratidão pela orientação generosa, pela paciência, pelo acolhimento e pela oportunidade de aprendizado. Foram exemplos para mim o seu profissionalismo e sua serenidade; sou grata por ter sido recebida com tamanha delicadeza, sinceridade e respeito.

Agradeço também ao professor Edy Brito e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), em especial ao corpo técnico do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais (LMQP), pela orientação, disponibilidade e parceria para a realização do pré-tratamento da matéria-prima e das análises essenciais para compor este trabalho.

Minha gratidão à Universidade Federal do Ceará, especialmente ao Laboratório de Termodinâmica e Processos de Separação, onde este trabalho teve início, e à Universidade do Minho, em particular ao Centro de Engenharia Biológica e ao grupo Biosystems, pela disponibilidade dos laboratórios e materiais de trabalho.

Agradeço também à Sara Silvério, Lina Ballesteros e à Cátia Pereira, pesquisadoras na

Uminho, pela colaboração e orientação nos trabalhos durante o período de intercâmbio de doutorado sanduíche. Sou grata pela receptividade, pelo acolhimento e pela direção que me proporcionaram para concluir os ensaios celulares, além de toda a ajuda na interpretação e organização dos dados.

Agradeço também às professoras membros da banca examinadora, Paulo Riceli e Fábria Andrade e Tigressa Rodrigues, pelo tempo dedicado, bem como pelas valiosas colaborações e sugestões oferecidas.

À Central Analítica da UFC, agradeço pela disponibilidade dos equipamentos e dos técnicos para a realização das análises morfológicas da matéria-prima.

Ao Laboratório de Pesquisa em Biomateriais e Bioprodutos, em especial aos professores Karine Andrade e Rodrigo Vieira, e ao pesquisador Fábio Souza, sou grata pelas análises microbiológicas, cuja contribuição foi fundamental para o enriquecimento dos resultados deste estudo

Por fim, reconheço que o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Tu a quem tomei desde os confins da terra, e te chamei desde os seus extremos, e te disse: Tu és meu servo, eu te escolhi, e não te rejeitei. Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou o teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a destra da minha justiça.” (Isaías 41:9-10)

RESUMO

As folhas da planta *Annona muricata* Lin., popularmente conhecidas como gravioleira, são ricas em compostos bioativos, como polifenóis e outros antioxidantes, com potencial aplicação nas indústrias farmacêutica e alimentícia. Esses compostos podem ser extraídos de forma eficaz utilizando solventes projetáveis denominados Solventes Eutéticos Profundos (*Deep Eutetic Solvents*- DES), uma classe de solventes inovadores e sustentáveis, com diferentes aplicações incluindo a extração de compostos de diversas biomassas. Neste estudo, foram utilizadas diferentes formulações de DES baseadas em Cloreto de Colina e Mentol como receptores de ligação de hidrogênio (*Hydrogen Bond Acceptors* – HBA), combinados com Ácido Lático, Ácido Oxálico e 1,2-Propanodiol como doadores de ligação de hidrogênio (*Hydrogen Bond Donors* – HBD). As extrações foram conduzidas por dois sistemas distintos: agitação com aquecimento e banho de ultrassônico, variando-se tempo e temperatura. As amostras foram analisadas por métodos espectrofotométricos para determinação do conteúdo total de extrativos, teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (ABTS, DPPH e FRAP). O desempenho dos DESs foi investigado através de caracterizações físico-químicas e térmicas, incluindo densidade, viscosidade, pH e Termogravimetria. Os DESs contendo Ácido Oxálico (CCAO) e Ácido Lático (CCAL) apresentaram os melhores desempenhos nas extrações, com condições ideais observadas na agitação a 50 °C por 120 minutos e no banho ultrassônico a 30 °C por 30 minutos. Os extratos obtidos com CCAO apresentaram os mais elevados índices de atividade antioxidante (ABTS = 244 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$; TPC = 130 mg GAE.g⁻¹), superando os extratos aquosos e etanólicos nas mesmas condições. Após recuperação com diclorometano (DCM) e hexano (HEX), observou-se bioatividade promissora. A fração CCAO-DCM apresentou atividade citotóxica contra células de câncer de mama (MDA-MB-231, IC₅₀ = 227 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), próstata (PC-3, IC₅₀ = 265,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e cólon (RKO, IC₅₀ = 259,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), mas apresentou seletividade aos fibroblastos saudáveis (BJ-5TA, IC₅₀ = 604,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Já a fração CCAO-HEX não foi citotóxica, mas apresentou atividade antimicrobiana, contra *S. aureus* e *P. aeruginosa* (MIC = 6,25 mg.mL⁻¹) e *E. coli* (MIC = 12,5 mg.mL⁻¹). Esses resultados demonstram que a extração com DES é uma estratégia eficaz e sustentável para obtenção de compostos com propriedades antioxidantes, anticancerígenas e antimicrobianas, com potencial de aplicação em formulações bioativas.

Palavras-chave: *Annona muricata* Lin; folhas de gravioleira; solventes eutéticos profundos; otimização de extração; compostos bioativos; atividade citotóxica.

ABSTRACT

The leaves of the *Annona muricata* Lin. plant, popularly known as soursop, are rich in bioactive compounds such as polyphenols and other antioxidants, with potential applications in the pharmaceutical and food industries. These compounds can be efficiently extracted using designer solvents known as Deep Eutectic Solvents (DES), an innovative and sustainable class of solvents with diverse applications, including the extraction of compounds from various biomass sources. In this study, different DES formulations based on choline chloride and menthol were used as hydrogen bond acceptors (HBA), combined with lactic acid, oxalic acid, and 1,2-propanediol as hydrogen bond donors (HBD). Extractions were carried out using two different systems: heated stirring and ultrasonic bath, with variations in time and temperature. The samples were analyzed using spectrophotometric methods to determine the total extractive content, total phenolic content, and antioxidant activity (ABTS, DPPH, and FRAP assays). The performance of the DES was further evaluated through physicochemical and thermal characterizations, including density, viscosity, pH, and thermogravimetric analysis. DES containing oxalic acid and lactic acid showed the best extraction performances, with optimal conditions observed at 50 °C for 120 minutes under agitation and 30 °C for 30 minutes in the ultrasonic bath. Extracts obtained using the oxalic acid-based DES (CCAO) exhibited the highest antioxidant activity (ABTS = 244 $\mu\text{mol trolox}\cdot\text{g}^{-1}$; TPC = 130 mg GAE $\cdot\text{g}^{-1}$), outperforming aqueous and ethanolic extracts under the same conditions. After recovery with dichloromethane (DCM) and hexane (HEX), promising bioactivity was observed. The CCAO-DCM fraction showed cytotoxic activity against breast cancer (MDA-MB-231, IC_{50} = 227 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), prostate cancer (PC-3, IC_{50} = 265.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), and colon cancer cells (RKO, IC_{50} = 259.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), while maintaining selectivity toward healthy fibroblasts (BJ-5TA, IC_{50} = 604.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). The CCAO-HEX fraction was not cytotoxic but exhibited antimicrobial activity against *S. aureus* and *P. aeruginosa* (MIC = 6.25 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$) and *E. coli* (MIC = 12.5 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$). These results demonstrate that DES-based extraction is an effective and sustainable strategy for obtaining compounds with antioxidant, anticancer, and antimicrobial properties, with potential applications in bioactive formulations.

Keywords: *Annona muricata* L.; soursop leaves; deep eutectic solvents; extraction optimization; bioactive compounds; cytotoxic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A Graviola e folha.	19
Figura 2 – Estrutura de dois tipos de acetogeninas. I anonacina $C_{35}H_{64}O_7$, II esquamocina $C_{37}H_{64}O_7$	24
Figura 3 – Mecanismo de um método de extração convencional.	30
Figura 4 – Esquema da formação de ponto eutético na produção de DES.	32
Figura 5 – Esquema do Solvente Eutético Cloreto de Colina-Ureia (CCU).	33
Figura 6 – Pré-tratamento das folhas de graviroleira.	36
Figura 7 – Esquemas dos sistemas de extração utilizados: a) Método de agitação SBH b) Método ultrassônico UBT.	38
Figura 8 – Sistemas de extração com solventes orgânicos: a) Método soxhlet aplicado à extração com Metanol e com Etanol b) Método Mixer em banho Dubnoff para extração com Etanol 50%.	39
Figura 9 – Caracterizações e análises realizadas para a biomassa, os DESs e os extratos.	40
Figura 10 – Etapas do teste de citotoxicidade e disposição dos extratos secos.	50
Figura 11 – a) Densidade b) Viscosidade dinâmica c) Tensão superficial dos DESs produzidos.	54
Figura 12- TGAs e DTGs para cada DES produzido.	57
Figura 13-DSC para todos os DES produzidos.	59
Figura 14 – Espectros FTIR dos DESs produzidos.	60
Figura 15 – Padrões de RMN para todos os DESs produzidos e moléculas identificadas para cada estrutura de DES: a) RMN de 1H b) RMN de ^{13}C	62
Figura 16 – Caracterização físico-química dos DESs: a) pH das misturas eutéticas a 25°C b) Concentração de íons cloretos detectados por titulação com $AgNO_3$ e c) Umidade relativa (%).	64
Figura 17 – Atividade antioxidante (*) do extrato de pó de folha de graviroleira com DES como solvente: Fenólicos totais das amostras das extrações a) SBH e b) UBT, e Atividade Antioxidante Total (ABTS) das extrações c) SBH e d) UBT.	66
Figura 18 – Capacidade antioxidante (*) das amostras de extrato em meio a DES após armazenamento. Valores para SBH a) FRAP c) ABTS e d) DPPH. Valores para UBT b) FRAP d) ABTS e f) DPPH.	70
Figura 19 – Cromatograma do extrato seco gerado a partir da extração metanólica em soxhlet.	73

Figura 20 – MEV do pó da folha de graviroleira a) 18 mesh, b) 32 mesh, c) 64 mesh, d) Partículas menores do que 64 mesh, e) Biomassa antes da extração. Após a extração: f) Soxhlet 24 horas, g) SBH com CCAL 1:4, h) SBH com CCAO, i) SBH com CCP, j) SBH com MAL, k) UBT com CCAL 1:4 e l) UBT CCP.	77
Figura 21 – Separação Líquido-Líquido com diferentes solventes voláteis: I-Acetona, II-Acetonitrila, III-Hexano, IV-Diclorometano, V-Acetato de Etila. a) Sistemas bifásicos entre as amostras de DES-Extrativos (*). b) Resultado após secagem da fase recuperada com solvente volátil (**).	78
Figura 22 – Atividade antioxidante (*) dos extratos da fase orgânica (**) obtidos por separação líquido-líquido: a) FRAP. c) ABTS. e) DPPH. Atividade antioxidante das amostras da fase DES (***): b) FRAP. d) IC50 % (ABTS) e f) IC50% (DPPH).	80
Figura 23 – Triagem das amostras da fase orgânica (*) na atividade citotóxica (**) em células de câncer de mama.	84
Figura 24 – Atividade citotóxica das amostras CCAO-DCM contra as linhagens celulares (a1) MDA-MB-231 (câncer de mama), (b1) RKO, (c1) PC-3 e (d1) BJ5-ta. Os gráficos a’–d’ representam os perfis de viabilidade celular utilizados para determinar os valores de IC ₅₀ de cada linhagem celular.	86
Figura 25- Ensaio de atividade antimicrobiana via espalhamento em placa (*) para as amostras: (A1) CCAO DCM e (A2) CCAO-HEX em diferentes concentrações.	89
Figura 26- Percentual de inibição microbiana obtido a partir do teste de microdiluição em caldo (*) com as amostras CCAO-DCM e CCAO-HEX frente a diferentes microrganismos patogênicos.	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classes de compostos bioativos encontrados nas folhas de graviola (<i>Annona muricata</i> L.).	22
Tabela 2 – Métodos de extração de compostos da folha da <i>Annona Muricata</i> Lin e suas respectivas atividades antioxidante ou biológicas registradas.	27
Tabela 3 – Solventes Eutéticos produzidos e designação.	37
Tabela 4 – Solventes orgânicos utilizados para Recuperação via separação líquido-líquido...47	
Tabela 5 – Linhas celulares utilizadas nos ensaios de citotoxicidade.	49
Tabela 6 – Extrativos totais via atividade antioxidante de extratos secos obtidos por extração exaustiva Soxhlet e Mixer.	72
Tabela 7 – Identificação do cromatograma UPCL gerado a partir do extrato metanólico do pó de folha de graviroleira.	74
Tabela 8- Faixa de concentração inibitória mínima (MIC) determinada para as amostras CCAO-DCM e CCAO-HEX frente às cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por meio do ensaio de microdiluição em caldo.	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGs	Acetogeninas
DES	<i>Deep Eutetic Solvent</i> - Solvente eutético profundo
SBH	<i>Stirrer with Bath heated</i> - Agitação em banho aquecido
UBT	<i>Ultrasound in a Bath Technique</i> - Técnica de banho ultrassônico
CCAL	DES formado por Cloreto de colina e ácido láctico
CCAO	DES formado por Cloreto de colina e ácido oxálico
CCP	DES formado por Cloreto de colina e 1, 2 propanodiol
MAL	DES formado por mentol e ácido láctico
CCAO (DCM)	Extrato pó de folha de gravioleira extraído com CCAO e recuperado com Diclorometano
CCAO (HEX)	Extrato pó de folha de gravioleira extraído com CCAO e recuperado com Hexano
SOX	Extração por soxhlet
MIX	Extração com mixer
TPC	<i>Total Phenolic Content</i> - Conteúdo fenólico total
ABTS	Atividade antioxidante pela captura do radical ABTS
DPPH	Atividade antioxidante pela captura do radical DPPH
FRAP	Atividade antioxidante pela redução do Fe (II)
MDA-MB-231	Linha celular de câncer de mama
PC-3	Linha celular de câncer de próstata
RKO	Linha celular de câncer de cólon
BJ-5ta	Linha celular de fibroblastos humanos saudáveis

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 Geral	18
2.2 Específicos	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Matéria prima: <i>Annona Muricata</i> Lin.	19
3.1.1 <i>As acetogeninas</i>	24
3.2 Métodos de extração de bioativos das folhas de <i>Annona muricata L.</i>	27
3.3 Solventes Eutéticos Profundos.....	31
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	36
4.1 Pré-tratamento da matéria prima.....	36
4.2 Produção dos Solventes Eutéticos Profundos.....	36
4.3 Procedimentos de extração.	38
4.3.1 <i>Extrações com DESs</i>	38
4.3.2 <i>Extrações com solventes Orgânicos</i>	39
4.4 <i>Caracterizações e análises</i>	40
4.5 <i>Caracterização dos DES produzidos</i>	40
4.6 Atividade antioxidante dos extratos	43
4.7 Cromatografia.....	46
4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura- MEV	46
4.9 Estratégia de recuperação dos extrativos do meio contendo DES	47
4.9.1 <i>Análise dos extratos Recuperados</i>	48
4.10 Ensaios de citotoxicidade	48
4.11 Ensaios antimicrobianos.....	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Caracterização dos DESs.	52
5.2 Extração de compostos: Caracterização de extrato antes e após recuperação.	65
5.3 Atividade Citotóxica	82
5.4 Atividade Antimicrobiana	88
6 CONCLUSÃO.....	94
7 PROPOSTA DE CONTINUIDADE.....	96
REFERÊNCIAS.....	97

1 INTRODUÇÃO

A natureza oferece uma vasta gama de recursos com potencial para auxiliar no tratamento de diversas doenças e o conhecimento popular pode servir como um guia valioso para identificar matérias-primas com propriedades curativas. Nesse contexto, a graviroleira, pertencente à família Annonaceae, é uma planta típica de climas tropicais amplamente utilizada na medicina tradicional indígena e na medicina alternativa para tratar condições como insônia, infecções parasitárias, neuralgia, reumatismo e câncer (Al kazman; Harnett; Hanrahan, 2023; Nolasco-González *et al.*, 2022; Veisaga *et al.*, 2023).

Estudos fitoquímicos das raízes, folhas e frutos da graviroleira revelaram a presença de vários compostos bioativos, incluindo flavonoides, alcaloides, cumarinas, lactonas, glicosídeos cardíacos, acetogeninas e outros compostos fenólicos (Nolasco-González *et al.*, 2022; Zine, 2018). Com base nesse conhecimento vêm sendo desenvolvidos diversos estudos experimentais, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, para analisar o potencial terapêutico desses extratos. Estes trabalhos mostraram que pequenas dosagens de extratos da folha da graviroleira possuem toxicidade seletiva, ou seja, os bioativos presentes atuam especificamente na interrupção do metabolismo de células inflamadas ou agentes patogênicos, sem causar danos às células saudáveis do organismo (Guillén-Meléndez *et al.*, 2024; Montalvo-González *et al.*, 2024; Veisaga *et al.*, 2023).

A maioria dos métodos utilizados para a extração e purificação de bioativos das folhas da graviroleira têm empregado procedimentos convencionais, como pressurização e agitação mecânica, com o uso de solventes como metanol e clorofórmio. Esses solventes são escolhidos por sua estabilidade molecular e baixo custo de obtenção. No entanto, devido à elevada toxicidade desses solventes, as etapas adicionais necessárias para purificar o extrato e ao alto custo energético das operações unitárias empregadas, surge a necessidade de desenvolver métodos mais sustentáveis, que possam ser aplicados em larga escala e preservem a qualidade dos produtos finais. Uma alternativa promissora seria a aplicação da extração sólido-líquido utilizando solventes não tóxicos com ação dupla, capazes de penetrar na parede celular vegetal e solubilizar os bioativos (Zhou; Fakayode; Li, 2023; Zou *et al.*, 2024).

Dentre os solventes adequados para essas funções se destacam os Solventes Eutéticos Profundos (*Deep Eutetic Solvent* - DES). Esses solventes são formados pela interação eletrostática entre um agente doador, como açúcares, álcoois e ácidos carboxílicos, e um receptor de hidrogênio, geralmente um sal de amônio quaternário (Dai *et al.*, 2013). Quando esses componentes são combinados, em temperaturas e proporções específicas, ocorre a

formação de uma mistura eutética com um ponto de fusão muito mais baixo do que os pontos dos componentes originais (Buarque *et al.*, 2025). Essa característica garante a estabilidade da mistura mesmo quando retorna à temperatura ambiente.

Os DESs constituem uma classe de solventes cujas propriedades podem ser ajustadas de maneira estratégica para atender às necessidades do processo ao qual são utilizados. Assim, devido às diferentes combinações possíveis e à flexibilidade na escolha dos componentes, essas misturas assumem a característica de solventes projetáveis (*solvent design*, em inglês) (Bubalo *et al.*, 2016; Florindo, *et al.*, 2019; Suresh *et al.*, 2022). Suas principais vantagens incluem baixa volatilidade, baixa ou nenhuma toxicidade, biodegradabilidade, fácil preparo e baixo custo de produção (Loukri *et al.*, 2022; Rashid *et al.*, 2023). Além disso, por serem geralmente formados por substâncias naturais ou biocompatíveis, os DESs representam uma alternativa mais segura do ponto de vista ambiental, quando comparados aos solventes orgânicos convencionais, alinhando-se aos princípios da química verde e contribuindo diretamente para os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) promovidos pela Organização das Nações Unidas (ONU) (Delso *et al.*, 2019). O uso de DESs se enquadra especialmente aos ODS 3 (Saúde e Bem-Estar), ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis) e ODS 15 (Vida Terrestre), por promoverem processos de extração mais sustentáveis, seguros e com menor impacto ambiental.

Estudos sobre a extração de bioativos de matrizes vegetais utilizando DESs mostram que as propriedades físico-químicas dos DESs, polaridade, viscosidade, densidade e miscibilidade, desempenham um papel crucial na seletividade e eficiência da extração, superando os resultados obtidos com solventes convencionais sob as mesmas condições operacionais (Cunha; Fernandes, 2018; Bubalo *et al.*, 2016). No entanto, questões relacionadas à transferência de massa devido à alta viscosidade dos DESs, à estabilidade da mistura química que compõe o solvente e à preservação dos compostos ativos ainda são áreas de análise e pesquisa. Além disso, a recuperação dos compostos bioativos ao final das extrações pode ser dificultada pela baixa volatilidade dos DES, o que limita o uso de técnicas convencionais de separação, como a evaporação, representando um desafio importante para sua aplicação como solventes.

Portanto, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de investigar a aplicação de diferentes tipos de DESs na extração eficaz de bioativos das folhas da graviroleira, otimizando as condições operacionais, como temperatura, e tempo de extração, respectivamente para os procedimentos de extração sólido-líquido por agitação. Para determinar esses parâmetros, foram realizadas quantificações da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos nos

extratos. Extrações utilizando solventes convencionais, como água, etanol e metanol, também foram conduzidas para fins comparativos.

Por fim foi desenvolvida uma estratégia para a recuperação dos compostos presentes no meio com DES. Os extratos obtidos foram aplicados em testes de citotoxicidade em células cancerígenas de mama, próstata e cólon, e células saudáveis de fibroblastos com o objetivo de comparar os níveis de toxicidade em células humanas. Além disso, os extratos recuperados também foram analisados quanto à atividade antimicrobiana, para identificar possíveis efeitos inibitórios contra cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar e avaliar o potencial dos Solventes Eutéticos Profundos (DES) numa estratégia alternativa de extração de compostos bioativos da folha da graviroleira e estabelecer as condições mais adequadas de extração utilizando em um sistema de extração sólido líquido.

2.2 Específicos

- Preparar e caracterizar DESs com potencial para a extração de bioativos de uma matriz vegetal.
- Aplicar os DESs como agentes de extração, correlacionando suas características físico-químicas com suas capacidades de extração de bioativos da folha da graviroleira;
- Comparar a extração de bioativos da folha da graviroleira utilizando os métodos de extração convencional de agitação em banho aquecido com um procedimento utilizando o banho ultrassônico.
- Avaliar o teor total de compostos extraíveis da folha da graviroleira utilizando metodologias convencionais em procedimentos exaustivos com Soxhlet e Mixer e comparar com dados dispostos na literatura;
- Obter as condições ótimas de operação em cada sistema de extração como temperatura; tempo de extração.
- Determinar a combinação de DES com melhor desempenho nas extrações, por meio da comparação de suas características físico-químicas e da atividade antioxidante promovida.
- Desenvolver uma estratégia para promover a separação e recuperação das moléculas alvo do meio com DES;
- Avaliar a citotoxicidade contra linhagens de células cancerígenas e normais e determinar o IC₅₀ desses extratos.
- Avaliar atividade antimicrobiana dos extratos e determinar a concentração inibitória mínima dos extratos contra microrganismos patógenos como *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.
- Avaliar os perfis cromatográficos dos extratos com o objetivo de identificar os compostos extraídos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Matéria prima: *Annona Muricata* Lin.

A planta *Annona muricata* L., que produz o fruto popularmente conhecido como "graviola", "guanábana" ou "soursop", pertence à família Annonaceae, da ordem Magnoliales. Esta espécie é altamente valorizada no mercado internacional devido ao sabor e aroma de seu fruto, que é consumido em diversas formas, além de apresentar variadas propriedades bioativas (Aguilar-Hernández *et al.*, 2022; Balderrama-Carmona *et al.*, 2020; Olaoluwa Oyedegia *et al.*, 2015).

No Brasil, essa árvore é predominantemente encontrada nas regiões Norte e Nordeste, onde o clima quente e úmido favorece seu desenvolvimento. Trata-se de uma planta lenhosa de porte intermediário, que pode apresentar-se como arbórea ou arbustiva, atingindo até 7 metros de altura. O fruto pode conter até 68% de polpa e alcançar um peso de até 2000 gramas, enquanto suas folhas possuem uma aparência brilhante e coloração verde-escura (Figura 1) (Al Kazman; Harnett; Hanrahan, 2023; Balderrama-Carmona *et al.*, 2020; Santos, 2014).

Figura 1 – A Graviola e folha.



Fonte: “Horto Didático de Plantas Medicinais do HU/CCS” (2020).

A polpa do fruto, as sementes, as raízes e as folhas dessa planta são amplamente reconhecidas por suas potentes atividades biológicas, incluindo propriedades antifúngicas, antimicrobianas, antitumorais, antidiabéticas e pesticidas, entre outras, as quais têm sido utilizadas na medicina alternativa como auxílio no tratamento de resfriados e problemas gastrointestinais, como diarreia e disenteria (Aguilar-Hernández *et al.*, 2022; Ali, 2022; Daddiouaissa *et al.*, 2019; González-López *et al.*, 2025; Olaoluwa Oyedegia *et al.*, 2015). Conforme a literatura, a polpa da graviola possui diversos bioativos, incluindo compostos fenólicos, alcaloides, terpenoides, saponinas, açúcares, vitaminas, ácidos graxos, entre outros.

Esses componentes fazem da graviola uma fonte valiosa de matéria-prima para a produção de diversos produtos medicinais (Adeyemi *et al.*, 2009; Badmus *et al.*, 2020; León-Fernández *et al.*, 2019; Santos, 2014; Smith; Shejwalkar, 2020).

A polpa do fruto da *Annona muricata* L. tem sido amplamente investigada em diferentes estudos, incluindo abordagens baseadas na extração de compostos bioativos pelo emprego de micro-ondas, bem como na aplicação direta de seus extratos utilizando líquidos iônicos como meios extratores (Daddiouaissa *et al.*, 2019). Segundo Daddiouaissa (2019), observou-se uma redução gradual na viabilidade celular da linhagem de câncer de mama MCF-7 com o aumento da concentração da polpa de *Annona muricata* em contato com as células, atingindo um IC₅₀ de 4,5 µg·mL⁻¹ após 72 h de incubação. Os autores concluíram que a inibição da viabilidade celular promovida pela polpa foi superior à obtida com o Taxol, agente quimioterápico comercial amplamente utilizado no tratamento do câncer.

Há diversos trabalhos como esse na literatura, contudo o fruto da gravioleira já é valiosamente empregue para consumo e é altamente perecível, tendo uma vida útil muito curta dependendo da temperatura de armazenamento (idealmente entre 10–15 °C) (Monarres-Cuevas *et al.*, 2022). Esse fator pode dificultar o uso dessa matéria prima em processos de tratamento para extração de compostos bioativos devido a impossibilidade do controle de degradação. Portanto a extração de tais compostos de alto valor agregado também presentes nas folhas se torna mais atraente do ponto de vista de processamento em grande escala.

Nesse sentido, o extrato das folhas da gravioleira tem sido tradicionalmente utilizado por povos indígenas e na medicina alternativa para o tratamento de infecções inflamatórias, insônia, infecções parasitárias, neuralgia e reumatismo. Além disso, diversos estudos *in vitro* e *in vivo*, sobre as diferentes formas de extração e aplicação farmacológica das folhas da gravioleira vêm sendo conduzidos (Sun *et al.*, 2016, 2017). Como no trabalho desenvolvido por Adeyemi *et al.* (2009), em que extratos aquosos e metanólicos das folhas foram utilizados para promover uma redução significativa nos níveis de glicose no sangue em ratos diabéticos.

Em um trabalho recente desenvolvido por Akinsiku, *et al.*, (2025), folhas de *Annona muricata* foram submetidas à maceração a quente (60–70 °C por 1 hora) seguida de extração a frio, utilizando solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e metanol), visando preservar compostos sensíveis ao calor. Os extratos obtidos foram incorporados a nanopartículas de prata e cobalto (Ag-Co) e avaliados quanto à atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. Taninos, fenóis, saponinas, alcaloides, flavonoides e glicosídeos cardíacos foram identificados, sendo o metanol o solvente mais eficiente (30% de rendimento). Esses

fitoquímicos atuaram como agentes redutores na síntese das nanopartículas, promovendo a redução de íons metálicos ($\text{Ag}^+/\text{Co}^{2+}$) e adsorção na superfície das NPs. As NPs apresentaram potente atividade antifúngica contra *A. niger* (25 mm de inibição), superando a gentamicina (13 mm), além de citotoxicidade dose-dependente na linhagem WEHI 164 ($\text{IC}_{50} = 84 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Em outro estudo conduzido por Oyedejia et al. (2015) foi investigada a atividade antimicrobiana de extratos metanólicos das folhas da graviroleira obtidos por maceração. Dentre os resultados destacam-se os extratos crus (sem separação de compostos), diluídos em acetato de etila (1 mg.mL^{-1}), que alcançaram um halo de inibição de até $31,3 \pm 1,5 \text{ mm}$ contra *Enterococcus faecalis*. A atividade antimicrobiana também foi investigada por Ali et al. (2022) por meio de estudos com Nanopartículas (NPs) à base de ZnO e relataram resultados interessantes após a administração oral por coelhos infetados com diversos microrganismos incluindo *E. coli* e *S. aureus*. Os autores constataram elevada sensibilidade das bactérias em dosagens de 2 mg.mL^{-1} de extrato encapsulado além de nenhum efeito negativo nos animais após a administração.

O efeito antiviral foi investigado utilizando-se o extrato aquoso das folhas, que demonstrou atividade antiviral a partir de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ após 5 horas de contato com bacteriófagos. Esse efeito é atribuído às altas concentrações de rutina, naringenina, ácido gálico e eugenol presentes nos extratos das folhas da graviroleira, que superam as concentrações encontradas em outros recursos naturais (Balderrama-Carmona et al., 2020).

Assim como nos trabalhos supracitados, diversas outras investigações têm sido realizadas a respeito das folhas da graviola, devido à sua rica composição fitoquímica e ao seu potencial farmacológico. Diversas classes de metabólitos secundários foram identificadas, incluindo acetogeninas, alcaloides, flavonoides, triterpenos, esteróis, taninos, saponinas e óleos essenciais (Ali, 2022). Esses compostos demonstram uma ampla gama de atividades biológicas, como propriedades citotóxicas, antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias e antiparasitárias, tornando as folhas de *A. muricata* candidatas promissoras para aplicações terapêuticas e farmacêuticas. O quadro a seguir (Tabela 1) apresenta um resumo dos principais compostos fitoquímicos identificados nas folhas de *Annona muricata*, suas respectivas classes, atividades biológicas relatadas.

Tabela 1 – Classes de compostos bioativos encontrados nas folhas de graviola (*Annona muricata* L.).

Classe de compostos	Compostos identificados	Atividades relatadas	Referências
Acetogeninas	Annonacina Annonacinona Solamina Corossolona	Citotóxica, antitumoral, antiparasitária	(Liaw <i>et al.</i> , 2002; Gavamukulya <i>et al.</i> , 2014; Bhardwaj <i>et al.</i> , 2019)
Alcaloides	Coreximina, Asimilobina, Reticulina, Anonaína, Isoboldina	Neuroativa, antiparasitária, antidepressiva, anticâncer	(Adewole & Ojewole, 2008; Hasrat <i>et al.</i> , 1997; Fofana <i>et al.</i> , 2011)
Flavonoides e Fenólicos	Quercetina, Kaempferol, Rutina, Luteolina, Homorientina, Angeretina, Quercetina, Daidzeína, Epigallocatequina, Emodina, Ácido cumárico, Ácido gálico	Antioxidante, anti- inflamatória, cardioprotetora	(Leboeuf <i>et al.</i> , 1980; George <i>et al.</i> , 2015; Gavamukulya <i>et al.</i> , 2014; Nawwar <i>et al.</i> , 2012)
Triterpenos e Esteróis	β -sitosterol, Estigmasterol, Campesterol, Ácido ursólico	Anti-inflamatório, hipocolesterolêmico, hepatoprotetor	(Adewole & Ojewole, 2008)
Taninos	Taninos condensados e hidrolisáveis	Antimicrobiano, adstringente	(Gavamukulya <i>et al.</i> , 2014)
Saponinas	(Não especificadas por nome)	Expectorante, antifúngico, imunoestimulante	(George <i>et al.</i> , 2015)
Óleos essenciais	Linalol, Geraniol, α - pineno, β -cariofileno	Antisséptico, antimicrobiano, relaxante	(Ragasa <i>et al.</i> , 2014)

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

A expressiva diversidade de compostos bioativos valiosos presentes nas folhas da gravioleira, como flavonoides, antraquinonas e acetogeninas, tem despertado interesse na pesquisa biomédica, especialmente pelo seu potencial farmacológico. Dentre as aplicações terapêuticas mais investigadas, destaca-se a atividade anticancerígena desses extratos naturais. Nesse sentido, diversas pesquisas envolvendo extratos das folhas da gravioleira vêm sendo realizadas com o objetivo de avançar na descoberta de terapias auxiliares e complementares ao tratamento do câncer (Daddiouaissa *et al.*, 2019; Hadisaputri *et al.*, 2021; Mutakin *et al.*, 2022).

De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), estima-se que em 2022 houve 20 milhões de novos casos de câncer e 9,7 milhões de mortes relacionadas à doença, com maior impacto em comunidades carentes (OPAS/OMS, 2024). Segundo a OMS, os cânceres mais comuns que estão entre os dez principais causadores de morte são os de mama, pulmão, próstata e cólon retal (Guillén-Meléndez *et al.*, 2024). Os tratamentos disponíveis variam conforme a localização e o estágio da doença, incluindo quimioterapia, cirurgia, radiação ou combinações desses métodos. Embora esses tratamentos representem avanços significativos, ainda são bastante invasivos, com efeitos colaterais que podem comprometer a qualidade de vida do paciente e potencialmente contribuir para o desenvolvimento de tumores secundários durante e após o tratamento (Guillén-Meléndez *et al.*, 2024).

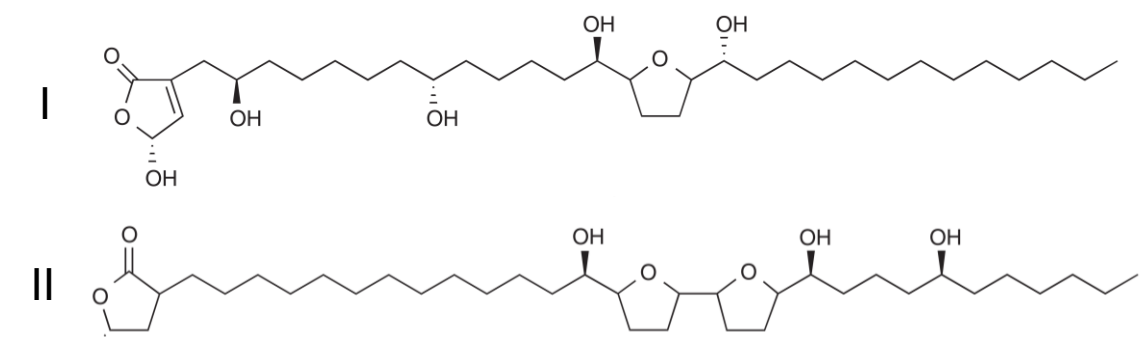
Além disso, são frequentes os casos de resistência celular aos efeitos dos fármacos, bem como problemas decorrentes da baixa seletividade dos agentes quimioterápicos (Hadisaputri *et al.*, 2021). Assim, o uso de extratos vegetais como alternativas terapêuticas ganha destaque. As folhas de *Annona muricata* têm demonstrado capacidade de induzir apoptose e inibir o crescimento de células cancerígenas, com vantagens atribuídas à seletividade e à menor toxicidade dos compostos naturais (Balderrama-Carmona *et al.*, 2020; Veisaga *et al.*, 2023).

Entre os principais compostos identificados, as acetogeninas (AGs) se destacam por sua exclusividade nas plantas do gênero *Annona* (família Annonaceae) e pelo alto potencial anticancerígeno. Mais de 400 tipos de acetogeninas já foram catalogadas em diferentes partes da planta, sendo as folhas a principal fonte de concentração destes compostos de alcaloides como aporfinas, isoquinolinas, açúcares imínicos e protoberberinas (Nolasco-González *et al.*, 2022; Santos, 2014). Por esse motivo, os extratos foliares da gravioleira vêm sendo amplamente estudados, com foco na extração, purificação e avaliação da atividade biológica desses metabólitos (Montalvo-González *et al.*, 2024; Santos, 2014; Smith; Shejwalkar, 2020; Sun *et al.*, 2016).

3.1.1 As acetogeninas

As acetogeninas formam um grupo de policetídeos derivados de ácidos graxos, compostos por longas cadeias alifáticas que contêm entre 35 e 37 átomos de carbono em sua estrutura (Figura 2) (Damrongrak *et al.*, 2022; Montalvo-González *et al.*, 2024; Smith; Shejwalkar, 2020; Torres *et al.*, 2012). Dentro das células vegetais, essas substâncias estão concentradas principalmente nas mitocôndrias, onde desempenham funções associadas ao metabolismo energético, e nos vacúolos, onde são armazenadas. Devido à sua função de defesa da planta, as acetogeninas podem ser liberadas em resposta a danos celulares ou ataques de patógenos servindo com antimetabólitos (Bermejo *et al.*, 2005).

Figura 2 – Estrutura de dois tipos de acetogeninas. I anonacina $C_{35}H_{64}O_7$, II esquamocina $C_{37}H_{64}O_7$.



Fonte: Moraes *et al.* (2016).

Inicialmente, acreditava-se que o uso do extrato de *Annona* poderia ser prejudicial devido a um possível efeito colateral neurodegenerativo, como o desenvolvimento de Parkinson e Alzheimer (Champy *et al.*, 2004; Lannuzel *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2022). No entanto, estudos subsequentes indicam que esse efeito depende da dose administrada e o consumo excessivo, como a ingestão de 2 a 3 gramas de pó de folhas de 3 a 4 vezes ao dia, poderia causar efeitos adversos no organismo. (Moraes, *et al.*, 2016; Nawwar *et al.*, 2012) Além disso, ao consumir as folhas diretamente, diversos isômeros das anonacinas, juntamente com outros compostos, também seriam ingeridos, o que pode ter superestimado o risco de neurotoxicidade associado às anonacinas (Moraes, *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2022).

Além disso, evidências mais concretas demonstraram que as acetogeninas, especialmente a anonacina (Figura 2-I), possuem toxicidade seletiva contra células neoplásicas, e demonstraram alta eficácia mesmo em células multirresistentes. Esses achados indicam seu

potencial como uma alternativa viável no tratamento do câncer, resultando em seu reconhecimento como medicamento anticâncer pelo *National Cancer Institute* (NCI) dos Estados Unidos (Damrongrak *et al.*, 2022; Lima *et al.*, 2022; Torres *et al.*, 2012).

Nos estudos realizados, verificou-se que doses muito baixas das acetogeninas atuam como inibidores do complexo mitocondrial, mas também podem atingir outros alvos por meio de interações covalentes. Nas células bacterianas, esses compostos inibem a NADH-ubiquinona oxidoredutase e a oxidase, localizadas no complexo mitocondrial I e na membrana plasmática, respectivamente, resultando na inibição da síntese de ATP (Adenosina Trifosfato) e consequente morte celular (Aguilar-Hernández *et al.*, 2022; Moraes *et al.*, 2018). Além disso, as acetogeninas perturbam o movimento de íons negativos ao longo da cadeia respiratória e interrompem as cascatas de prótons essenciais para a respiração celular, o que compromete a viabilidade das células tumorais (Abe *et al.*, 2008).

Apesar da relevante importância farmacológica das acetogeninas, diversos fatores limitam sua aplicação clínica. Esses compostos são altamente lipofílicos, o que restringe suas aplicações, pois exigem que o processamento da matéria-prima seja realizado sem o uso de água como solvente (Montalvo-González *et al.*, 2024). Além disso, diferentemente dos outros compostos antioxidantes existentes na folha, as AGs são estáveis apenas em temperaturas de até 50-60 graus Celsius, podendo se degradar facilmente devido a sua longa cadeia conectada a várias hidroxilas e γ -lactonas (Alali; Liu; McLaughlin, 1999; Allegrand *et al.*, 2010; Allen; Greiner; Wishart, 2015). Diante da possibilidade de degradação, o uso de sistemas que exigem altas temperaturas, como nos processos de maceração e soxhlet, podem não ser a melhor estratégia para obter esses bioativos. Isso leva à necessidade de explorar alternativas para substituir os métodos convencionais de extração (Damrongrak *et al.*, 2022; Montalvo-González *et al.*, 2024; Poyer *et al.*, 2022).

Antes de prosseguir, vale ressaltar que os trabalhos mais recentes, desde 2020, já não se concentram em estratégias de recuperação ou rendimento da extração. Nesta nova fase, o foco tem sido direcionado para a entrega eficaz dos princípios ativos no organismo. Dentre as alternativas mais recentes, o encapsulamento em nível nanométrico, conhecido como nanossuspensões (NPs), tem sido explorado para estudar a interação de extratos com células cancerígenas (Badmus *et al.*, 2020; Damrongrak *et al.*, 2022). Nessa abordagem, os compostos bioativos são revestidos por um agente anfifílico, capaz de se ligar ao composto e interagir favoravelmente com a água. Essa técnica oferece diversas vantagens, como a rápida absorção pelas membranas biológicas, maior carga de material bioativo e baixa toxicidade (Damrongrak *et al.*, 2022).

Seguindo essa metodologia, nanopartículas à base de óxido de cobre (CuO) impregnadas com extratos da planta *Annona muricata* L., contendo acetogeninas, foram testadas em tratamentos contra câncer de mama utilizando a linha celular MCF-7, alcançando uma concentração de inibição de 18,92 mg.mL⁻¹ (Mahmood *et al.*, 2022). Em outro estudo, nanopartículas de prata foram investigadas e demonstraram eficácia contra células de câncer de próstata (PC3), com um valor de IC₅₀ de 48,17 µg.mL⁻¹, preservando seletivamente as células normais PNT1 (Gavamukulya *et al.*, 2021). Badmus *et al.* (2020) também realizaram uma investigação citotóxica dos extratos, dessa vez utilizando NPs de Platina (Pt) obtendo uma concentração de inibição em torno de 53% contra células de epiderme humana (HaCat), concluindo que os compostos extraídos teriam limiar de toxicidade definido a partir da dose.

Mais recentemente, Montalvo-González *et al.* (2024) realizaram a impregnação de um extrato concentrado de acetogeninas em nanopartículas à base de lecitina de soja e polietilenoglicol, visando potencializar sua atividade antimicrobiana. Os resultados demonstraram uma inibição significativa do crescimento de *Enterococcus faecalis* (83%) e *Listeria monocytogenes* (86%) com uma concentração de apenas 320 µg.mL⁻¹ de nanopartículas impregnadas em 83,33% de compostos bioativos.

De maneira geral, nos estudos mais recentes têm sido aplicadas estratégias de extração convencionais, como a maceração a frio, para a obtenção dos extratos antes da etapa de encapsulamento. Métodos como esse consistem em manter o material vegetal em contato com o solvente por períodos prolongados, sob temperatura ambiente, o que permite preservar compostos bioativos sensíveis ao calor. Contudo, embora funcionais, essas abordagens ainda estão sujeitas a longos tempos de extração e ao uso excessivo de reagentes tóxicos, como o metanol, uma vez que a extração em água não é eficiente, considerando que grande parte dos compostos extraíveis são hidrofóbicos (Nolasco-González *et al.*, 2022). Além disso, muitos dos solventes utilizados não oferecem proteção contra a oxidação imediata dos compostos após a extração.

Não apenas isso, processos de extração como soxhlet e maceração conseguem atingir uma parte significativa dos compostos fenólicos e alcaloides; no entanto, ainda apresentam limitações quanto ao acesso às regiões intracelular, onde se localizam as acetogeninas, e à complexidade da matriz vegetal (Azmir *et al.*, 2013; López-Romero *et al.*, 2022). Essas moléculas exigem uma forte interação com o solvente e uma difusão eficiente para serem extraídas de forma satisfatória. Dessa forma, a eficiência do encapsulamento pode estar limitada à quantidade de compostos obtidos na etapa prévia de extração, tornando fundamental a

continuidade das investigações voltadas à otimização dos métodos de obtenção desses bioativos.

3.2 Métodos de extração de bioativos das folhas de *Annona muricata* L.

Diferentes procedimentos foram utilizados para promover a recuperação de compostos bioativos da folha da *Annona muricata* L. Os estudos mais recentes e as atividades biológicas em geral dos extratos são apresentados na Tabela 2

Tabela 2 – Métodos de extração de compostos da folha da *Annona Muricata* Lin e suas respectivas atividades antioxidante ou biológicas registradas.

Método	Solvente	Tempo	Temperatura	Atividade Antioxidante	Atividade Biológica Registrada	Referência
Maceração	Etanol 70%	24 h	Não informada	Não inclusa	Citotóxica: (Mama-MCF-7): IC ₅₀ = 48,31 µg.mL ⁻¹	(Hadisaputri <i>et al.</i> , 2021)
Sonicação/ Decocção/ Infusão	Acetona 80%/ Água/ Água	6 m/ 10 m/ 10 m	25 °C/ 100 °C/ 98 °C	ABTS: 250/20/20 mmol. 100 mL ⁻¹ DPPH: 400/50/50 mmol. 100 mL ⁻¹ FRAP: 1100/200/170 mmol. 100 mL ⁻¹	Citotóxica: (Artêmias): Não citotóxico	(Nolasco-González <i>et al.</i> , 2022)
Maceração com Agitação	Ácido acético 10% em etanol	72 h	Não informada	ABTS: 23,61 mmol Trolox.g ⁻¹ ; DPPH: 24,9 mmol Trolox.g ⁻¹	Antiviral (Bacteriófagos): 0,5 mg.mL ⁻¹ Antihemolítica (Eritrócitos humanos): 51,21%	(Balderrama-Carmona <i>et al.</i> , 2020)
Shaker em Banho Termostático	Etanol 50%	15m	80 °C	TPC: 166,4 mg GAE.g ⁻¹ ; ABTS: 1516 µmol trolox.g ⁻¹	Não inclusa	(Moraes <i>et al.</i> , 2018)
Agitação (Vortex) E Banho Ultrassônico	DES (cloreto de colina e xilitoll)	2 h	45 °C	TPC: 33 mg GAE.g ⁻¹ ; DPPH:	Não inclusa	(Leal <i>et al.</i> , 2022)

				65 mg Trolox. g ⁻¹ FRAP: 40 mg Trolox. g ⁻¹		
				1		
Cocção	Água	2 h	40 °C	DPPH- IC₅₀: 51,80 µg.mL ⁻¹ ; ABTS -IC₅₀: 30,78 µg.mL ⁻¹	Antidiabética (α-amylase): IC ₅₀ = 0,9 µg.mL ⁻¹ (α-glucosidase): IC ₅₀ = 3,32 µg.mL ⁻¹ Antimicrobiana: Concentração do extrato:100 µg.mL ⁻¹ ; (<i>S. aureus</i>)= 61,29%; (<i>P. eruginosa</i>)= 59,34% Citotóxica: (Pele-HaCat) 57,37%	(Badmus <i>et al.</i> , 2020)
Maceração	Metanol	48 h	40 °C	Não inclusa	Antimicrobiana: (<i>E. coli</i>): MIC= 625 µg.mL ⁻¹ (<i>S. aureus</i>): MIC= 156 µg.mL ⁻¹ ; (<i>P. aeruginosa</i>): MIC= 625 µg.mL ⁻¹	(Pinto <i>et al.</i> , 2017)
Soxhlet	Etanol	5 h	Ebulição do etanol (78 °C)	TPC: 2,83% GAE.g ⁻¹ DPPH-IC₅₀: 228,86 mg.mL ⁻¹ ABTS-IC₅₀=: 12,24 mg.mL ⁻¹	Não inclusa	(Santos <i>et al.</i> , 2022)
Maceração com evaporação a vácuo	Etanol	8 h	50 °C	Não inclusa	Citotóxica: (Prostata-PC-3): 63 µg.mL ⁻¹	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
(1) Vaporização/ (2) Agitação	Ar quente/ Etanol 50%	1h/ 24h	100 °C/ 55°C	Não inclusa	Citotóxica: (Macrófagos-RAW 264.7): (1) N.S (2) extrato com 500 µg.mL ⁻¹ viabilidade celular (48h) =40%	(Kim <i>et al.</i> , 2016)

Agitação	Acetato de etila	Não informado	Não informado	Não inclusa	Citotóxica: (Ovário - SKOV3) IC ₅₀ = 15 µg.mL ⁻¹	(Damrongrak <i>et al.</i> , 2022)
Incubação	DMSO	5 min	Não informada	Não inclusa	Citotóxica: (pâncreas) 100 µg.mL ⁻¹ 32% de viabilidade celular	(Torres <i>et al.</i> , 2012)
Soxhlet	Metanol	30 min	65 °C	Não inclusa	Citotóxica: (mama-MDA-MB-231) IC ₅₀ = 315 µg.mL ⁻¹ (MCF-7) IC ₅₀ =245 µg.mL ⁻¹	(Veisaga <i>et al.</i> , 2023)
Shaker em banho termostático	Metanol	72 h	40 °C	FRAP: 25,80 mg.100 g ⁻¹	Antidiabética: (α-glucosidase) IC ₅₀ = 34,85 mg.mL ⁻¹	(Olasehinde <i>et al.</i> , 2022)
Maceração	Etanol	72 h	25-30 °C	Não inclusa	Citotóxica (Artêmias salinas) CL ₅₀ = 324, 07 µgmL ⁻¹ (Ovário OVCAR-8) IC ₅₀ = 22,65 mg.mL ⁻¹ (Colón HCT-116) IC ₅₀ = 19,97 mg.mL ⁻¹	

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

TPC- *Total Phenolic Content*- Conteúdo fenólico total.

GAE- *Gallic acid equivalente*- Equivalente de ácido gálico.

ABTS- Atividade antioxidante pela captura do radical livre ABTS.

DPPH- Atividade antioxidante pela redução do radical DPPH.

FRAP- Capacidade Antioxidante de Redução do Ferro.

N.S.= valores de citotoxicidade não significativos.

IC₅₀ = Concentração que contribuiu com 50% de inibição.

CL₅₀ = Concentração Letal de 50% de mortos.

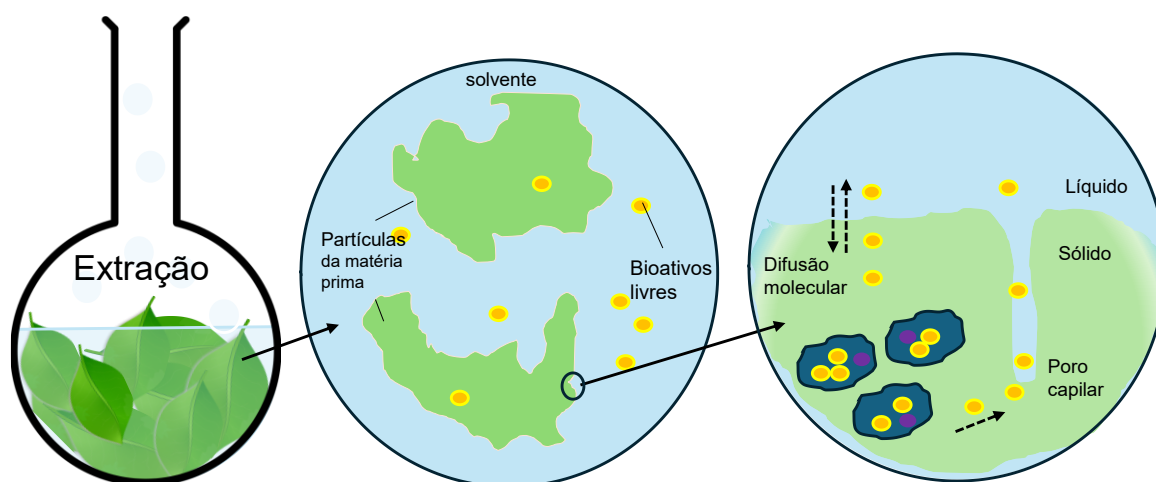
Todos esses estudos geraram dados significativos em relação à atividade oxidante e biológica, incluindo propriedades anticancerígenas, antivirais e antidiabéticas dos extratos de folha da graviroleira. No entanto, entre os procedimentos destacados, alguns requerem tempos de operação superiores a 48 horas, como nos processos de maceração, enquanto outros, como a sonicação por ultrassom, permitem a obtenção de resultados em menos de 10 minutos de

operação. Os resultados em termos de inibição ou atividade antioxidante variam entre os métodos.

Procedimentos mais avançados como os que utilizam ultrassom de ponteira são altamente eficientes na extração de compostos bioativos, pois promovem maior dilaceração das partículas devido ao efeito da cavitação (López-Romero *et al.*, 2022). No caso da extração assistida por ultrassom, por exemplo, ocorre um fenômeno da geração de microbolhas que implodem, criando zonas de alta pressão e temperatura, o que facilita a ruptura das paredes celulares e a liberação dos compostos de interesse, resultando em uma extração mais eficaz e rendimentos superiores (Lima, 2019). Por outro lado, métodos que dependem de temperatura ou do efeito de dissolução proporcionado pelo solvente exigem um tempo de operação mais longo e recuperam uma menor quantidade de compostos, mas são mais simples e, portanto, de menor custo, competindo com os métodos mais avançados (Carvalho; Gutierrez; Gomes, 2018; Sik *et al.*, 2020).

Além disso, nem todos os procedimentos são capazes de acessar a quantidade necessária de compostos bioativos alvos. Nesse sentido, métodos mais simples correm o risco de não fornecer energia suficiente para romper a parede celular. No contexto da extração de compostos a partir de matrizes celulares vegetais, os métodos de extração convencionais podem gerar dois tipos de efeitos nas fibras da biomassa (Figura 3): (i) Arraste de compostos através do transporte de massa de bioativos livres na superfície da amostra, funcionando como uma espécie de macro-extração; (ii) Difusão dentro dos poros capilares ou por meio de interação com a superfície da partícula (Santos, 2014).

Figura 3 – Mecanismo de um método de extração convencional.



Fonte: Adaptado de Santos (2014).

A macro-extração ocorre de forma natural e depende principalmente do método de pré-tratamento das folhas, como procedimentos de pulverização que podem aumentar a área de contato, mas que também podem promover e facilitar a exposição de certos compostos como óleos essenciais. Por outro lado, a extração de dentro da partícula exige o uso de sistemas que promovam a difusão molecular, o que só é possível se as condições físicas do meio ou as propriedades do solvente forem compatíveis.

O principal dilema reside em optar por um procedimento de alto custo que permita a extração eficiente de forma independente ou utilizar um método mais simples e econômico, que, entretanto, requeira uma segunda etapa para alcançar uma extração eficaz. Nesse contexto, algumas propostas inovadoras estão sendo estudadas, como o uso de solventes moldáveis. Um exemplo é o emprego de solventes eutéticos à base de açúcares como xilitol, sorbitol e 1,2-Propanediol para promover a extração. Observou-se que, utilizando um procedimento simples, como um banho ultrassônico, foi possível detectar compostos fenólicos e antioxidantes provenientes do pó da folha de graviroleira no extrato diluído em DES após a extração (Leal, 2020; Ueda *et al.*, 2022).

Os DESs podem então ser uma estratégia para obter compostos a matriz celular vegetal utilizando sistemas de extração de baixo custo. A seguir serão discutidas algumas características inerentes desses solventes e um apanhado dos métodos de extração que já foram empregados na literatura.

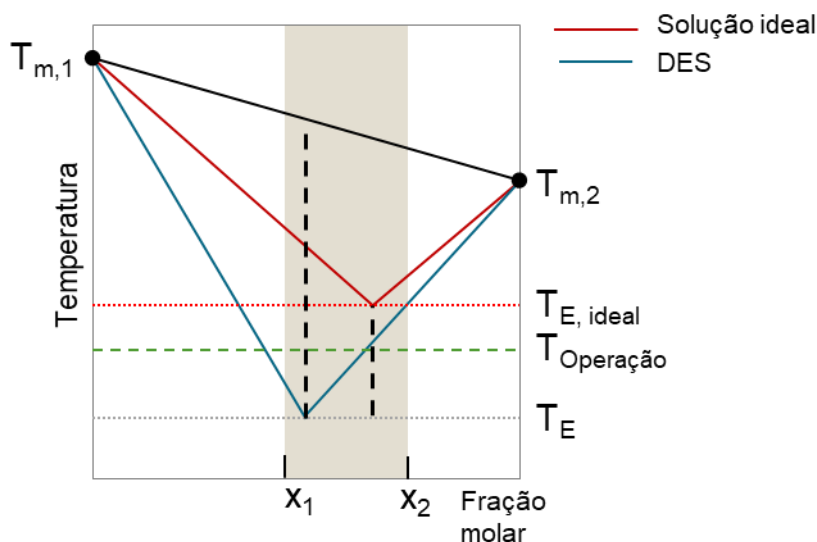
3.3 Solventes Eutéticos Profundos

Os DESs são misturas de componentes inicialmente imiscíveis que, em dada temperatura e composição bem definida, se homogeneizam formando então o ponto eutético, como está representado no esquema da Figura 4. O esquema mostra que dois compostos 1 e 2, com pontos de fusão definidos em $T_{m,1}$ e $T_{m,2}$, respectivamente, podem ser combinados em frações molares ideais x_1 e x_2 , numa condição de temperatura $T_{E, ideal}$. Nesse ponto há formação de uma mistura em estado cujo ponto de fusão (T_E) é inferior aos de seus predecessores individuais e sua condição é semelhante à de um sólido fundido em temperatura ambiente (Catarina; Costa, 2016; Correia, 2021).

A formação dos DESs geralmente envolve a combinação de um agente doador com um agente receptor de hidrogênio. De acordo com a literatura, sais de amônio quaternário podem interagir por meio de seus íons, estabelecendo ligações de hidrogênio com componentes doadores como vitaminas, aminas, álcoois derivados de açúcares e ácidos carboxílicos (Costa,

2016; Silva, 2018; Ueda, 2020). Essas interações, baseadas em fortes forças eletrostáticas, resultam em substâncias com elevados valores de densidade e viscosidade.

Figura 4 – Esquema da formação de ponto eutético na produção de DES.



Fonte: Leal (2020).

T_{m1} – Temperatura de fusão do componente 1.

T_{m2} – Temperatura de fusão do componente 2.

x_1 e x_2 - Frações molares ideais dos componentes 1 e 2, respectivamente.

$T_{E, ideal}$ - Temperatura de fusão teórica de uma solução ideal (não eutética) formada pelos compostos 1 e 2.

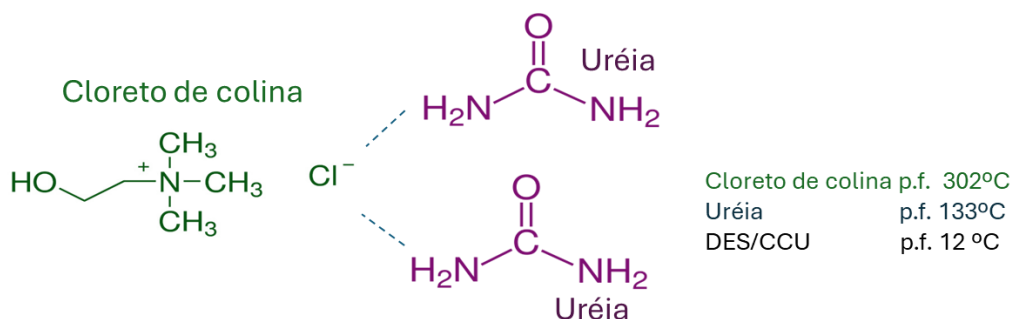
T_E – Temperatura real de fusão de um DES formado pelos compostos 1 e 2.

$T_{Operação}$ – Temperatura na qual o DES permanece na fase líquida e pode ser utilizado como solvente em operações.

Na Figura 5, é apresentada a estrutura de um DES formado pela interação do sal cloreto de colina (ChCl), com duas moléculas de ureia. A figura mostra que o ponto de fusão final da estrutura é significativamente mais baixo (12 °C) em comparação com os de seus precursores, e que as ligações de hidrogênio são estabelecidas para formar o novo composto (Costa, *et al.*, 2020; Sik *et al.*, 2020; Silva, 2018; Ueda, 2020; Zou *et al.*, 2024). Essas interações intermoleculares são sempre estabelecidas entre um agente receptor de hidrogênio (HBA - Hydrogen Bond Acceptor) e um agente doador de hidrogênio (HBD - Hydrogen Bond Donor). Esses componentes interagem por meio de forças eletrostáticas, o que reduz a energia necessária

para formar um produto com um ponto de fusão inferior ao dos seus componentes individuais (Osamede Airouyuwa *et al.*, 2024; Pan *et al.*, 2021).

Figura 5 – Esquema do Solvente Eutético Cloreto de Colina-Ureia (CCU).



Fonte: Adaptado de Costa (2019).

*CCU- Mistura eutética formada por cloreto de colina e ureia

Dentre as vantagens dos DESs como solventes, destacam-se a baixa volatilidade, inércia química, alta biodegradabilidade, reciclabilidade, facilidade de preparação, baixo custo de produção e baixa toxicidade (a depender da combinação formada), alinhando-se aos princípios da química verde (Loukri *et al.*, 2022; Rashid *et al.*, 2023; Zhou; Fakayode; Li, 2023). Além disso, destaca-se a possibilidade de preparar diferentes tipos de DESs com propriedades específicas para aplicações variadas, o que se enquadra no conceito de "solvent designing" (solvente projetável). Por exemplo, pode-se produzir um DES com características hidrofílicas ou fortemente hidrofóbicas, o que permite uma maior diversidade de aplicações e a criação de solventes com vantagens exclusivas, capazes de extrair diferentes componentes de cada matriz vegetal de forma mais eficiente, facilitando o isolamento de compostos-alvo específicos. Essas características tornam os DESs altamente competitivos em relação aos solventes orgânicos tradicionais (Dwamena, 2019; Lomba *et al.*, 2021; Santos, 2014).

Na literatura são encontrados diversos trabalhos que apontam elevada eficiência no processo de extração de fenólicos utilizando os DESs. Em um dos casos, Bubalo *et al.* (2016) constataram a elevada capacidade de um DES formado por ChCl e ácido Oxálico na extração de fenólicos do tipo antocianinas da casca de uva, sob condições brandas de temperaturas (30 a 90 °C) em bateladas de 30-90 minutos, com os métodos de extração em Shaker, micro-ondas e banho ultrassônico. Na comparação entre os métodos os autores também fizeram extrações com água, metanol e HCl e constataram a melhor eficiência dos DESs na extração dos compostos com destaque para o uso do ultrassom que demonstrou ser método mais eficiente.

Em outro estudo recente, Ueda *et al.* (2022) utilizando DES à base de açúcares e ácidos, foi investigada a extração sólido-líquido de vários compostos fenólicos das folhas da uvaíia, uma fruta semelhante à uva. Os pesquisadores compararam dois métodos de extração: agitação em banho termostatzado e ultrassom. O ponto ótimo de extração foi identificado no sistema de agitação a 65 °C, com uma proporção de 1:30 (m/v) entre massa de pó de folha e volume de DES. O DES composto por ChCl e ácido láctico apresentou o melhor desempenho, resultando em extratos com atividade antioxidante (DPPH) de 100 mg Trolox.g⁻¹ e um teor de fenólicos totais de 140 mg de ácido gálico.g⁻¹, superando as extrações realizadas com água e etanol nas mesmas condições.

Loukri *et al.* (2022) realizaram com sucesso a extração de cafeína do café utilizando DES formado por ChCl e glicerol na razão molar de 1:3. O processo foi conduzido em um sistema de agitação, com tempos variando de 5 a 120 minutos e temperaturas entre 30 e 80 °C, além de diferentes proporções de DES diluído em água. As condições ótimas foram identificadas em extrações a 45 °C, utilizando uma solução aquosa de DES a 70% (m/v). Os resultados demonstraram que esse método supera a eficiência da extração realizada com água e metanol sob as mesmas condições.

A cana-de-açúcar também foi estudada como biomassa para a remoção de lignina, conforme relatado por (Varilla-Mazaba *et al.*, 2022). Nesse estudo foram utilizados DESs à base de ChCl combinado com glicerol ou ureia em extrações sólido-líquido realizadas em banho de areia. Com a temperatura otimizada a 160 °C, foi possível alcançar uma remoção de 89,5% da lignina após 13 horas de operação. Em outro trabalho, foi realizada a extração de polifenóis do bagaço de maçã, também utilizando um DES à base de colina combinada com glicerol, ácido láctico e ácido cítrico, em banho ultrassônico a 40 °C por 40 minutos (Rashid *et al.*, 2023).

A folha da graviroleira também já foi tratada com vários tipos de DESs num estudo desenvolvido por Leal *et al.* (2022). Os DESs escolhidos foram produzidos a base de ChCl e açúcares como glicerol, sorbitol, xilitol e 1,2-propanediol como doadores de H⁺. O 1,2-Propanediol demonstrou-se como uma das misturas mais eficientes nas extrações de compostos fenólicos, alcançando a marca de 40 mg de ácido gálico.g⁻¹ em 3 horas de operação a 30 °C num sistema de banho ultrassônico aplicado por Leal *et al.* 2022.

Além disso, vários outros estudos investigaram a extração de bioativos polifenólicos de frutas cítricas, como cascas de toranja, mandarina e limão, assim como de bagaços, peles de frutas e folhas (Zhou; Fakayode; Li, 2023). Em particular, o uso de biomassa descartada, como bagaços e peles, tem gerado grande interesse no emprego do DES para, por meio de aplicação

de procedimentos simples e de baixo custo, valorizar esses resíduos, transformando-os em produtos de alto valor farmacológico.

Nesses trabalhos observou-se um destaque para as características químicas e físicas de cada DES produzido, como o nível de hidrofobicidade, acidez e polaridade, como fatores decisivos para a seletividade dos compostos fenólicos extraídos. Contudo, ainda há necessidade de aprimoramentos nas metodologias de extração abordadas e solução de problemas ligados transferência de massa, uma vez que a elevada viscosidade dos DESs dificulta a motilidade do meio. Adicionalmente, elucidações a respeito da exposição a umidade ou adição de água no solvente ainda carecem de desenvolvimento já que, em alguns casos, pode haver a ruptura das ligações de hidrogênio que, por sua vez podem suprimir a capacidade de extração (Lomba *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2017; Zhou; Fakayode; Li, 2023).

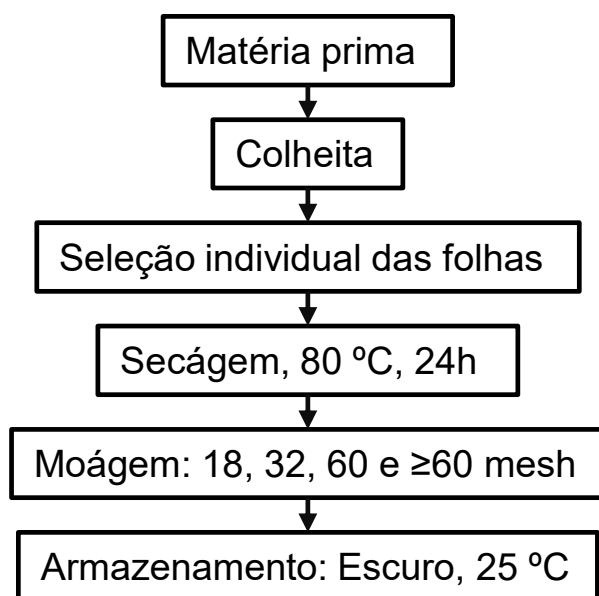
A recuperação de extrativos por meio de DES em extrações sólido-líquido traz grandes vantagens em relação às operações convencionais. No entanto, informações mais concretas sobre a estabilidade das moléculas e o modo de interação com as células vegetais ainda precisam ser obtidas. Além disso, mesmo que as ligações de hidrogênio sejam fortes e resistentes, em determinadas condições de umidade e/ou de temperatura, pode ocorrer a ruptura dessas ligações e a formação de conformações distintas. Nesses casos, os íons do sal de amônio são atraídos pelos hidrogênios das moléculas de água, resultando na desestruturação do DES que prejudicaria a extração. Por isso, para realizar a extração eficiente de AGs e outros compostos bioativos da folha da graviola faz-se necessário um estudo aprimorado das condições ideais de processo e investigação dos diferentes tipos de DESs que melhor podem interagir com cada bioativo.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Pré-tratamento da matéria prima

As folhas foram obtidas do reaproveitamento de resíduo de poda de gravioleiras localizadas na região da Chapada do Apodi, na cidade de Limoeiro do norte-CE, Brasil, Latitude: 5° 8' 56" Sul e Longitude: 38° 5' 52" Oeste. As etapas do pré-tratamento das folhas são apresentadas na Figura 6. As folhas colhidas foram pré-selecionadas para remoção de material com colônias de fungos ou em início de decomposição, em seguida secas em estufa com circulação e renovação de ar (SL 102) a 80 °C, por 24 horas. As folhas secas foram então moídas em um moinho de facas (Fortnox star FT 60) e finalmente peneiradas e devidamente identificadas quanto à granulometria específica do pó obtido (Leal, 2020; Ueda, 2020). Todo o material foi armazenado à temperatura ambiente (25 °C), ao abrigo da luz e do calor, em sacos de polietileno.

Figura 6 – Pré-tratamento das folhas de gravioleira.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

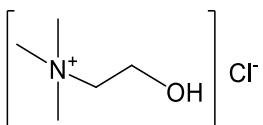
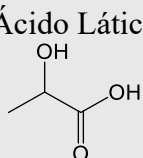
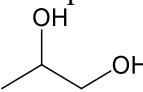
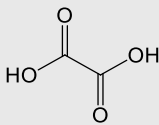
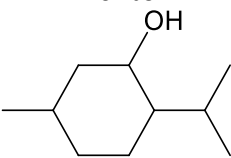
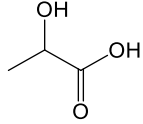
4.2 Produção dos Solventes Eutéticos Profundos

Os DESs produzidos e seus componentes, bem como suas estruturas, são apresentados na Tabela 3. Foram preparados dois tipos de misturas eutéticas, incluindo quatro misturas hidrofílicas e uma mistura parcialmente hidrofóbica. Os DESs hidrofílicos possuem como agente receptor de H⁺ (HBA) o Cloreto de Colina (Sigma-Aldrich, ≥ 98%), e como agentes doadores de H⁺ (HBD) o Ácido láctico (Dinâmica, ≥ 85%), o 1,2-Propanediol (Sigma-

Aldrich, $\geq 99\%$) e o Ácido Oxálico (Dinâmica, $\geq 99,5\%$). Já o DES hidrofóbico foi produzido com Mentol (Êxodo Científica, P.A.) como agente receptor de H^+ e Ácido Lático como agente doador.

As misturas foram preparadas de acordo com a metodologia desenvolvida por Dai *et al.* (2013) para misturas formadas pela combinação mista entre compostos sólidos e líquidos, e por Abbott *et al.* 2004 para misturas formadas a partir de precursores sólidos. O preparo dos DESs iniciou-se com a quantificação volumétrica ou gravimétrica dos componentes de cada DES, e em seguida a homogeneização em banho aquecido com temperatura entre 60-80 °C, por 30 minutos. O sistema foi mantido com controle de temperatura de ± 2 °C até obtenção de uma mistura líquida homogênea no recipiente, caracterizando o ponto eutético. Adicionalmente, para as misturas hidrofílicas, secou-se previamente o Cloreto de colina em estufa a 60 °C por 24 horas antes da produção dos DESs, para remoção de umidade.

Tabela 3 – Solventes Eutéticos produzidos e designação.

HBA	HBD	Razão Molar	Nomenclatura
Cloreto de Colina 	Ácido Lático 	1:4	CCAL (1:4) *
		1:2	CCAL (1:2) *
	1,2-Propanediol 	1:2	CCP *
	Ácido Oxálico 	1:1	CCAO **
Mentol 	Ácido Lático 	1:2	MAL *

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

* Produzido de acordo com a metodologia proposta por Dai *et al.* (2013).

** Produzido de acordo com a metodologia descrita por Abbott *et al.* (2004).

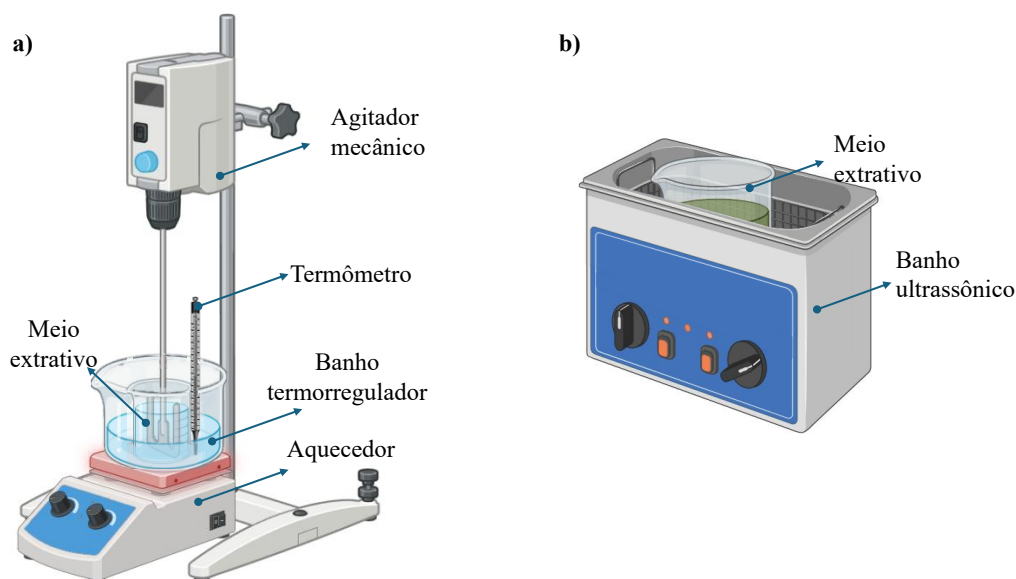
4.3 Procedimentos de extração.

4.3.1 Extrações com DESs

As extrações de compostos do pó da folha de graviroleira foram realizadas com base nas metodologias descritas por Ueda *et al.* (2020) e por Leal *et al.* (2020) com algumas modificações. Todos os DESs produzidos foram utilizados como solventes em um sistema de extração com agitação em banho aquecido (*Stirrer in a Bath Heated- SBH*) e em sistema com banho ultrassônico (*Ultrasound Bath Technique- UBT*) similar ao esquema apresentado na Figura 7 (a) e (b), respectivamente.

No Método SBH, o tempo de extração foi fixado em 120 min, com composição fixa de 1:10 $m_{\text{amostra}}/V_{\text{DES}}$ e variação de temperatura de 30-70° C. Já no método de extração UBT a temperatura do banho foi mantida fixa em 30 °C, assim como a composição de 1:10 $m_{\text{amostra}}/V_{\text{DES}}$, entretanto o tempo de operação foi realizado num intervalo de 30-240 min com verificação constante da temperatura da mistura DES-Pó de folha.

Figura 7 – Esquemas dos sistemas de extração utilizados: a) Método de agitação SBH b) Método ultrassônico UBT.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Ao final de cada extração, todo o material sólido foi removido do meio líquido contendo DES e extrativos. Inicialmente, o processo foi realizado por centrifugação em centrífuga de bancada (KASVI K14-4000) a 3500 rpm, por 15 minutos, seguido de filtração a vácuo utilizando uma bomba (Prismatec-131) acoplada a um Kitassato de 250 mL, contendo um funil

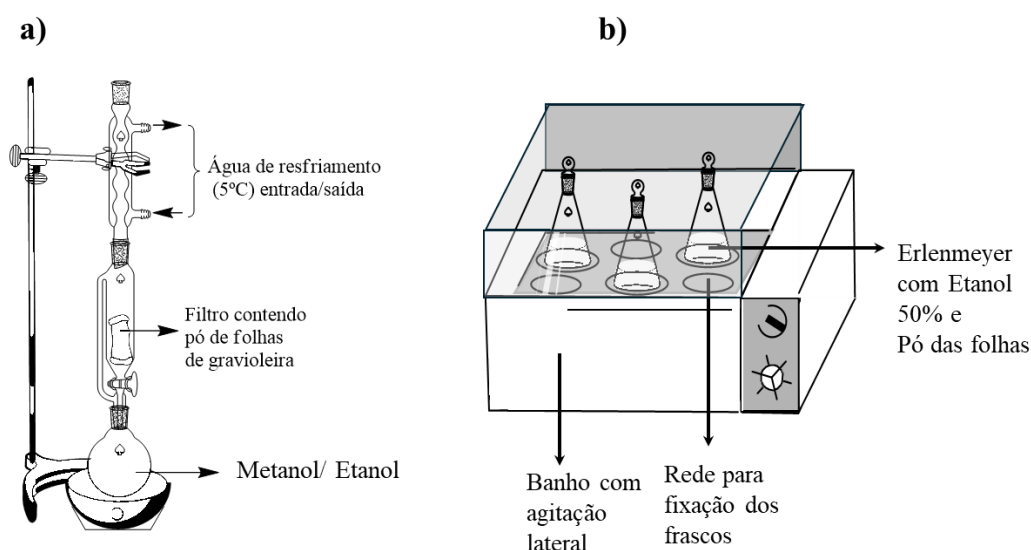
de vidro. O sobrenadante de cada extração foi então filtrado no sistema com o auxílio de um filtro de nylon com área de poro de 0,5 mm². Tanto a fase líquida quanto a borra (material sólido restante) foram armazenados sob refrigeração a -18 °C para análises posteriores.

4.3.2 Extrações com solventes Orgânicos

Outros métodos de extração foram realizados para fins de comparação com as extrações com DES nas condições ótimas de operação obtidas. Tais procedimentos foram realizados empregando-se água destilada e etanol (Synth, 95%) como solventes, na proporção 1:10 m/v, para os métodos SBH, a 50 °C por 120 min, e UBT, a 30 °C por 30 min de extração. Os extratos diluídos foram tratados da mesma maneira que seus pares extraídos com DES, quanto à filtração a vácuo para remoção da borra e quanto ao armazenamento.

O sistema soxhlet (SOX) foi empregue para determinação do teor de extrativos totais por extração metanólica e etanólica de compostos antioxidantes do pó da folha de graviroleira. Na extração via SOX (Figura 8-a) realizou-se primeiramente uma extração exaustiva em três ciclos de 8 horas de operação com Metanol (Ebulição= 64,7 °C, Synth, 99,9%) como solvente. Em outro momento o SOX foi novamente empregado, dessa vez em um ciclo único de 5 horas com etanol (P.E=78,37 °C, Neom, 95%) como solvente, assim como descrito previamente por Santos *et al.* (2022).

Figura 8 – Sistemas de extração com solventes orgânicos: a) Método soxhlet aplicado à extração com Metanol e com Etanol b) Método Mixer em banho Dubnoff para extração com Etanol 50%.



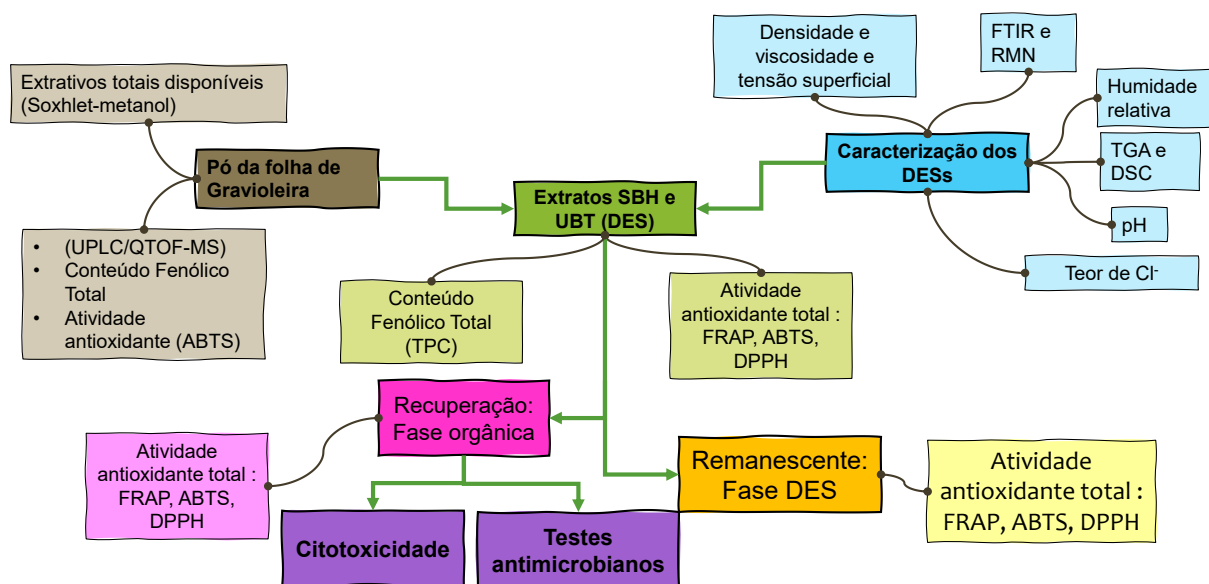
Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Adicionalmente, foi realizado um procedimento de extração para fins comparativos utilizando a metodologia aprimorada por Moraes *et al.* (2018). Um agitador do tipo mixer em banho Dubnoff (Figura 8-b) foi empregue para as extrações em Erlenmeyer, com um solvente composto por água e etanol 50% (v/v) na proporção de 1/20 ($m_{amostra}/V_{solvente}$). As operações foram realizadas em duplicata, durante 15 minutos, a 50 °C.

4.4 Caracterizações e análises

Em cada etapa, desde o preparo do pó das folhas, a formulação dos DESs até a obtenção dos extratos, foram realizados procedimentos analíticos visando à caracterização dos produtos envolvidos. Todas as análises, bem como a estrutura geral das caracterizações, estão apresentadas na Figura 9 e serão discutidas nas seções seguintes.

Figura 9 – Caracterizações e análises realizadas para a biomassa, os DESs e os extratos.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

4.5 Caracterização dos DES produzidos

i. Dados fluidodinâmicos (Densidade, Viscosidade e Tensão superficial)

As medidas de viscosidade dinâmica (μ) e densidade (ρ) foram tomadas em um viscodensímetro Anton Paar (Stabinger Viscometer- SVM 3000 M) a 0,1 MPa em um intervalo de temperaturas de 20-90 °C, com incerteza de $\pm 0,00005 \text{ g.cm}^{-3}$ para densidade e $\pm 0,35\%$ para

a viscosidade, com base nas especificações do equipamento. Os ensaios foram reproduzidos em triplicata a partir da injeção de até 5 mL de cada amostra no equipamento previamente estabilizado na temperatura de cada medição. Os parâmetros de limpeza do equipamento para injeção de diferentes amostras foram estabelecidos em até 0,0012 g.cm⁻³, a 20 °C (BESSA *et al.*, 2020).

Também foram obtidos dados de tensão superficial dos DESs por meio do método do anel de Du Nouey, operado em um Tensiômetro (Kruess, EasyDine K-20), acoplado a um banho termostático (Julabo, F25-ED) e a um sensor de temperatura de platina Pt-100. As análises de tensão superficial foram realizadas em um intervalo de 30-90 °C, com padrão de incerteza do equipamento de 0,01 mN.m⁻¹ para uma variação de temperatura de até 0,1°C (Alves *et al.*, 2020).

ii. Resistência térmica

Informações sobre a estabilidade térmica das amostras foram obtidas por meio de Análise Termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) de acordo com as metodologias descritas por Dias (2016), Paveglio, (2016) e Savi (2019) com modificações. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Tecnologia da Biomassa-Embrapa. As análises termoanalíticas foram conduzidas utilizando cadinhos de cerâmica para TGA e panelinhas de alumínio para DSC. Na TGA, as amostras foram aquecidas sob fluxo de nitrogênio ou ar sintético (40 mL/min), à pressão de 0,2 MPa, com rampa de aquecimento de 10 °C/min, em uma faixa de temperatura de 30-800 °C. Para a DSC, foi utilizado fluxo de nitrogênio de 50 mL/min, com panelinha vazia como referência e calibração realizada com índio. O programa térmico seguiu as etapas: equilíbrio inicial a 20 °C, aquecimento a 10 °C/min até 40 °C, seguido de resfriamento a 10 °C/min até -80 °C, isoterma de 10 minutos e posterior aquecimento a 10 °C/min até 80 °C.

iii. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

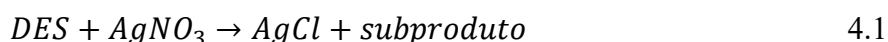
A composição dos DESs foi investigada a partir de espectros FTIR gerados em um Cary 630 (Agilent Technologies) na região de 650-4000 cm⁻¹, com um total de 32 varreduras e resolução de 4 cm⁻¹. A metodologia utilizada seguiu o padrão previamente otimizado para caracterização de Líquidos Iônicos desenvolvidos no laboratório de pesquisa (Bessa *et al.*, 2020).

iv. *Ressonância Magnética Nuclear (RMN)*

A análise química de prótons ^1H e de carbonos ^{13}C por RMN foi realizada com diluição das amostras em 550 μL de Dimetilsulfóxido Delterado ($\text{DMSO-}d_6$), sem pré-tratamento, condicionadas em capilares de 8'' e diâmetro de 5 mm. Os experimentos de RMN foram obtidos em um espectrômetro (nmr600-vnmrs600), com 600 MHz, acoplado a um inverso de 5 mm de detecção One Probe™ (H-F/15N-31P) e com gradiente Z blindado ativamente. Os dados foram adquiridos a 25 °C, com pulsos calibrados, 64 varreduras por amostra, 48k de pontos no domínio do tempo, numa janela espectral de 16,0 ppm e tempo de aquisição de 5,0 s e de relaxamento de 30,0 s (Reis *et al.*, 2016).

v. *Quantificação argentimétrica de Íons Cl^- livres*

Realizou-se a estimativa de íons cloretos, por meio da quantificação volumétrica obtida da titulação de uma solução de AgNO_3 (0,01 M), de acordo com a metodologia descrita por Martins *et al.* (2016). As misturas eutéticas foram colocadas em triplicata em Erlenmeyers (2,5 mL) e tituladas com a solução de AgNO_3 (0,01 M) até a completa formação de um precipitado esbranquiçado e turvo, característico de AgCl . Os volumes utilizados foram empregados para determinar o número de mols da solução titulante e, considerando a interação equimolar entre os reagentes (Equação 4.1), a concentração de Cl^- em cada DES foi calculada pelo número de mols reagidos da solução titulante, dividido pelo volume do componente titulado.



vi. *Determinação de pH*

As medidas de pH foram tomadas em um pHmetro de bancada modelo Satra, PHS-3E. Após calibração do equipamento com soluções padrão de pH equivalente a 7,0 e a 4,0, foi introduzido o eletrodo do pHmetro em um recipiente contendo cerca de 5 mL de cada DES. As limpezas do eletrodo entre as medições foram feitas com álcool 70° e água destilada e resultados obtidos minimamente em triplicata.

vii. *Teor de Umidade*

As análises de umidade relativas foram obtidas em Karl fisher (Metrohm 870 KF, Titrino plus) utilizando solução de clorofórmio/metanol na razão 3:1 (v/v) (Bessa *et al.*, 2020). As

medidas foram obtidas em triplicata e foram repetidas esporadicamente para confirmação da qualidade dos DESs usados nas extrações.

4.6 Atividade antioxidante dos extratos

Os extratos foram avaliados inicialmente quanto ao teor de atividade antioxidante total, pelo método de captura do radical livre (ABTS), e quanto Conteúdo Fenólico Total (*Total Phenolic Content- TPC*) (Leal 2020; Silveira *et al.*, 2018). Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Fisiologia E Tecnologia de Pós-Colheita da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA (Fortaleza-CE, Brasil).

Após um período de 6 meses decorridos da extração, os extratos foram verificados novamente quanto ao potencial antioxidante de redução de Ferro (FRAP- *Ferric reducing antioxidant power*), ABTS e potencial de eliminação de radicais DPPH livres (*Free Radical Scavenging Activity* DPPH) em parceria com o LBBS - *Sustainable Bioprocesses and Bioproducts Laboratory* na Universidade do Minho (Braga- Portugal).

i. Conteúdo Fenólico Total- TPC

O procedimento utilizado para a determinação de TPC iniciou-se com a diluição dos extratos em álcool etílico, com o objetivo de obter absorbâncias dentro da curva padrão de ácido gálico (Sigma-Aldrich, $\geq 97\%$) previamente preparada. Aliquotas de 150 μL de cada diluição foram adicionadas a tubos de ensaio contendo 850 μL de água, 1 mL de uma solução aquosa 1:3 (v/v) do reagente Folin-Ciocalteu (Êxodo Científica), 2 mL de uma solução de carbonato de sódio anidro P.A. a 20% (Na_2CO_3) e 2 mL de água destilada.

Após um período de repouso de 30 minutos na ausência de luz, os frascos foram centrifugados a 2000 rpm por 2 minutos, transferidos para cubetas de acetato e, em seguida, lidos a 700 nm em um espectrofotômetro UV-Vis (Silveira *et al.*, 2018). A determinação do TPC para cada amostra foi realizada a partir dos valores de absorbância medidos. Esses valores de absorbância foram então correlacionados com as concentrações estabelecidas na curva padrão de ácido gálico (GAE), utilizando a equação 4.4. Os resultados foram expressos em miligramas de GAE por grama de pó de folha (mg GAE. g^{-1}).

$$ABS_{amostra} = Interseção_{GAE} \times Concentração_{amostra} + Inclinação_{GAE} \quad 4.2$$

ii. *Método de captura do radical livre ABTS^{•+}*

O método de captura do radical livre ABTS^{•+} foi iniciado com a preparação de uma curva de calibração utilizando o padrão de Trolox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, Sigma-Aldrich, $\geq 97\%$), com leituras realizadas em um espectrofotômetro UV-Vis (Agilent Cary 300). Em seguida, foram feitas diluições das amostras de extrato úmido com DES diluídos em etanol (Synth, 95%) para quatro concentrações que atendessem aos limites da curva de calibração de Trolox. Posteriormente, alíquotas de 10 μ L de cada diluição foram colocadas em tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 3 mL de uma solução de ABTS^{•+} (2,2-AZINO-BIS-(Sal diamônio do ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico, Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$) diluída em álcool etílico (85%) e previamente calibrada para uma absorbância de $0,7 \pm 0,05$ a 734 nm. Após um repouso de exatamente 6 minutos, todo o conteúdo dos tubos foi transferido para cubetas de acetato e imediatamente lido em espectrofotômetro a 734 nm.

O procedimento foi conduzido em triplicata e para cada alíquota, os valores de absorbância foram medidos e utilizados para gerar uma curva linear que relaciona a concentração da substância com a absorbância medida, conforme descrito na Equação 4.2. A partir dessa curva, foi possível determinar a concentração necessária para alcançar 50% de inibição (IC50%). Em seguida, utilizando a Equação 4.3, foi calculada a capacidade antioxidante da amostra. Os resultados obtidos foram expressos μ mol de Trolox por grama de pó de folha (μ mol Trolox. g^{-1}) (Leal *et al.*, 2022; Silveira *et al.*, 2018; Ueda *et al.*, 2022).

$$ABS_{cubetas} = Interseção \times Concentração_{alíquota} + Inclinação \quad 4.3$$

$$Capacida\ antioxidante\ ABTS\ \left(\frac{\mu mol_{Trolox}}{g_{amostra}}\right) = \frac{IC50\%_{Trolox}\left(\frac{\mu mol_{Trolox}}{L}\right)}{IC50\%_{amostra}\left(\frac{g_{amostra}}{L}\right)} \quad 4.4$$

Os ensaios de ABTS, realizados no LBBS-Uminho, foram conduzidos com base na metodologia descrita por Ballesteros *et al.* (2015), com algumas modificações. Após o preparo da curva padrão de Trolox e a diluição das amostras em etanol (Fisher Chemical, 99,8%), foram escolhidas quatro concentrações para cada amostra, correspondendo à faixa de 20-80% da capacidade de inibição, em relação ao valor de absorbância da solução de ABTS, previamente calibrada para uma absorbância de $0,7 \pm 0,01$ a 734 nm (Silveira *et al.*, 2018).

Para cada concentração, foram realizados ensaios em quadruplicata em placas de 96 poços, nas quais cada poço foi preparado com uma alíquota de 10 μL da amostra, adicionada a 290 μL da solução de ABTS diluída em tampão de acetato ($\text{CH}_3\text{COONa}-\text{CH}_3\text{COOH}$, 20 mM). A placa foi então deixada em repouso no escuro por 30 minutos e, em seguida, lida em um leitor de microplacas (Multiskan Sky, Pt) a 734 nm. Os cálculos foram realizados seguindo-se a mesma metodologia utilizada para determinação da capacidade antioxidante via ABTS obtida por ensaios em cubetas, nas equações 4.2 e 4.3, e os resultados também foram expressos em $\mu\text{mol Trolox. g}^{-1}$.

iii. *Potencial Antioxidante de Redução de Ferro- FRAP*

A metodologia para a determinação de FRAP baseou-se no procedimento descrito por Benzie e Strain (1996). Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços em quadruplicata, nas quais, em cada poço, foi adicionada uma alíquota de 10 μL da amostra diluída em etanol, na concentração de 0,01 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, seguida de 290 μL de uma solução reagente FRAP, composta por uma solução 10 mM de TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine, Sigma-Aldrich, $\geq 97\%$). A solução de TPTZ foi preparada somente no dia da realização dos ensaios e foi composta por uma solução de HCl 40 mM, uma solução 20 mM de FeCl_3 , e por um tampão de acetato ($\text{CH}_3\text{COONa}-\text{CH}_3\text{COOH}$, 0,3 M) na proporção 1/1/10 (v/v/v), respectivamente. A placa foi mantida por 15 minutos a 37 °C no escuro e, finalmente, lida a 593 nm em um leitor de microplacas. Os testes foram realizados em quadruplicata, e os resultados são apresentados em função da curva padrão de $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, em mmol de Fe(II).g^{-1} de amostra, como apresentado na equação 4.5.

$$ABS_{amostra} = \text{Interseção}_{\text{Fe(II)}} \times \text{Concentração}_{\text{Fe(II)equivalente}} + \text{Inclinação}_{\text{FE(II)}} \quad 4.5$$

iv. *Potencial de eliminação de radicais (DPPH)*

O procedimento para determinação do DPPH foi previamente descrito por Ballesteros *et al.* (2015) e consistiu inicialmente na preparação de um padrão de Trolox diluído em metanol, para determinação dos limites da curva de calibração. Após a seleção de concentrações amostrais com gradiente de inibição no intervalo de 20-80%, alíquotas de 25 μL das amostras foram então adicionadas em quadruplicata aos poços de placas de 96 poços, seguido de 200 μL de uma solução de DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl, Aldrich) diluído em solução de

metanol (80%) e calibrada para uma absorbância de $0,7 \pm 0,01$, a 515 nm. As placas foram deixadas em descanso por 1 hora no escuro e depois lidas em leitor de microplacas a 515 nm. Os resultados apresentados em função do padrão, em μmol de Trolox. g^{-1} de amostra e o equacionamento seguiu a mesma metodologia utilizada para determinar o ABTS nas equações 4.2 e 4.3.

v. *Tratamento estatístico*

O programa GraphPad Prism (versão 9.00) foi utilizado para a análise estatística dos resultados, aplicando-se a análise bidimensional de variância (ANOVA) para pares de médias, seguida pelo teste de múltiplas comparações de Tukey. As comparações foram realizadas entre as diferentes condições de extração, como temperatura e tempo de operação, e entre os diferentes tipos de DESs nas mesmas condições de operação (Costa *et al.*, 2020). Os resultados são apresentados como média e desvio padrão das análises ($\pm$ S.D).

4.7 Cromatografia

A composição do extrato obtido na operação exaustiva por SOX com metanol foi determinada por um Sistema de Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplado a um Espectrômetro de Massas com um Analisador de Quadrupolo e Tempo de Voo (UPLC-ESI-QTOF-MS/MS, Waters, EUA) (Costa *et al.*, 2020). O sistema UPCL pertence à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, Fortaleza-CE, Brasil) e foi operado com uma coluna de separação Waters Acquity BEH C18 (150 mm $\times$ 2,1 mm, 1,7 μm) ajustada a 40 °C. Foi utilizado um volume de injeção de uma alíquota de 5 μL de extrato metanólico diluído (20 mg.mL^{-1}) em acetonitrila (LiChrosolv®, ≤ 30 ppm H_2O) e filtrado com um filtro hidrofílico de PTFE (Analítica) com um diâmetro de poro de 0,22 μm . A alíquota foi submetida a um gradiente exploratório de 30 minutos e uma taxa de fluxo de 0,3 mL.min^{-1} . A fase móvel foi composta de água deionizada e acetonitrila, ambas contendo ácido fórmico (0,1% v/v) (Ribeiro *et al.*, 2021).

4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura- MEV

As características morfológicas do pó de folha de gravioleira e do material residual obtido após as extrações (Borra) foram examinadas por Microscopia Eletrônica de Varredura

(MEV). Antes das análises por MEV, as amostras foram fixadas nos suportes com fitas de carbono e, em seguida, metalizadas com 20 nm de Au. As imagens foram registradas por um microscópio eletrônico FEI, Quanta 450-FEG a 1000 - 1500 kV, no qual foram geradas a partir de 100 μm (1300x), 10 μm (7500x) e 5 μm (15000x) para cada amostra.

4.9 Estratégia de recuperação dos extrativos do meio contendo DES

Foi adotada uma estratégia analítica para a recuperação dos extrativos do meio contendo DES com o objetivo de aplicar os extratos secos posteriormente em ensaios de citotoxicidade e atividade antimicrobiana. Para isso foram realizados ensaios de separação líquido-líquido. Para isso, as amostras de extrativo misturadas com DES foram colocadas em contato com solventes orgânicos voláteis, conforme listado na Tabela 4, na proporção de 1:2 (v/v). O sistema amostra-solvente foi agitado em um agitador de bancada por 2 minutos e, em seguida, centrifugado (Eppendorf centrifuge 5804 R) a uma rotação de 3100 rpm por 10 minutos.

Os tubos foram deixados em repouso por 5 minutos para permitir a estabilização das interfaces do sistema bifásico. Em seguida, a fase contendo o solvente orgânico e os extrativos recuperados foi removida. A fração de recuperação com o solvente volátil (fase orgânica) foi separada por sucção, utilizando uma pipeta de 1000 μL , e transferida para tubos Falcon de massa conhecida. A fase contendo DES (fase DES) foi evaporada a temperatura ambiente em uma capela de exaustão, enquanto a fase orgânica foi submetida a secagem por evaporação com N_2 durante 72 horas. Por fim, a massa dos extratos secos foi determinada por diferença gravimétrica dos tubos vazios inicialmente e após secagem, contendo os extrativos.

Tabela 4 – Solventes orgânicos utilizados para Recuperação via separação líquido-líquido.

Solventes orgânicos	Procedência e pureza
Acetato de Etila	Fisher Chemical, 99,5%
Acetona	Fisher Chemical, 99,8%
Acetonitrila	Fisher Chemical, 99,9%
Diclorometano	Fluca, 99,9%
Hexano	Fisher Chemical, 95%

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

4.9.1 Análise dos extratos Recuperados

Os extratos secos recuperados e a fase DES remanescente foram avaliados quanto ao potencial antioxidante utilizando as metodologias FRAP, ABTS e DPPH, conforme descrito anteriormente. No entanto, foi necessário ajustar o preparo das soluções radicais para os ensaios de ABTS e DPPH devido ao elevado teor de compostos hidrofóbicos presentes nos extratos recuperados.

Originalmente, as soluções radicais de ABTS e DPPH eram preparadas com água e metanol a 80%, respectivamente. No entanto, devido à alta quantidade de compostos hidrofóbicos nos extratos, que dificultavam a dissolução adequada dos radicais e as leituras, optou-se por preparar as soluções em álcool etílico a 95% e metanol a 95%, respectivamente para ABTS e DPPH. Essa alteração garantiu a melhor dissolução dos radicais e a precisão dos ensaios com as amostras recuperadas. Os procedimentos realizados com as amostras da fase DES não necessitaram de modificações, pois estas já estavam em condições adequadas para as metodologias originais.

4.10 Ensaios de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no LCCT (Cell and Tissue Culture Laboratory – UMinho, Braga, Portugal) com as linhas celulares listadas na Tabela 5. Todo o procedimento seguiu a metodologia descrita por Ferreira *et al.* (2023) com as etapas apresentadas na Figura 10. A manipulação das células foi realizada sob condições de esterilidade em uma câmara de fluxo laminar vertical classe II (PCR-UV). Para a diluição e manutenção das células, utilizou-se um meio denominado DMEM completo, composto por meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) adicionado de soro fetal bovino (FBS- *Fetal Bovine Serum*) e penicilina-estreptomicina na proporção de 89/10/1 (v/v/v)

Tabela 5 – Linhas celulares utilizadas nos ensaios de citotoxicidade.

Linha celular	Tipo	Concentração por poço (cells.mL⁻¹)	Designação
MDA-MB-231	Câncer de mama	1x10⁵	ATCC HTB-26
RKO	Câncer de colón retal	2 x10⁵	ATCC CRL-2578
PC-3	Câncer de próstata	1x10⁵	ATCC CRL-1435
BJ-5TA	Fibroblastos	1x10⁵	ATCC CRL-2522

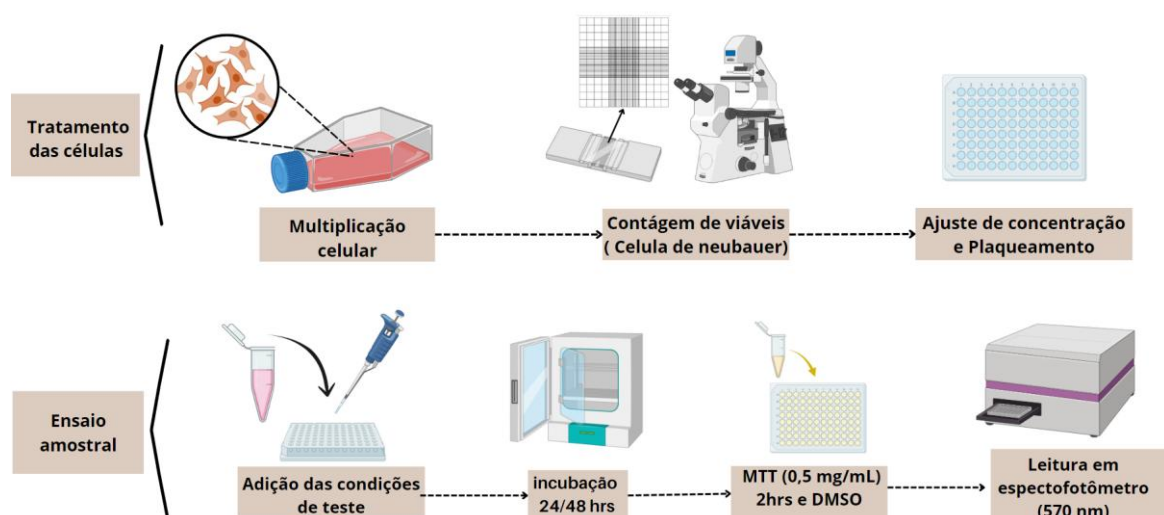
Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Os frascos foram mantidos em uma estufa com 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa a 37 °C até a contagem das células, utilizando uma câmara de contagem de células de Neubauer. Em seguida, foram realizados o plaqueamento em duplicata de 100 µL da solução de células com as concentrações ajustadas em placas estéreis de 96 poços. Após uma incubação de 24 horas, o conteúdo do meio de cada poço foi substituído pelas amostras de extrativos recuperados (Alves *et al.*, 2024). Essas amostras foram previamente diluídas para 10 mg.mL⁻¹ em PBS (*Phosphate Buffered Saline*) com 8,3% de DMSO, homogeneizadas em banho ultrassônico por 15 minutos e esterilizadas por filtração com filtro PTFE de 0,45 µm, conforme esquematizado na Figura 9.

Foram utilizadas nos ensaios apenas as amostras mais promissoras, selecionadas com base nos resultados dos testes de atividade antioxidante do material recuperado, especificamente aquelas extraídas com hexano e diclorometano, provenientes da extração SBH com CCAL 1:4 e CCAO. Nos ensaios de citotoxicidade, inicialmente prepararam-se as soluções dos extratos em PBS, diluindo-os de 750-50 µg.mL⁻¹ em DMEM completo. Após esvaziar os poços, mantendo apenas as células aderidas, adicionou-se 100 µL das soluções de extrato a cada poço e as placas foram então incubadas novamente por 24 ou 48 horas, dependendo do tipo de ensaio. Os controles utilizados incluíram o controle positivo, no qual as células foram mantidas apenas em contato com o meio DMEM completo, e o controle com a solução de PBS contendo DMSO a 8,33%, diluída em DMEM completo na mesma proporção utilizada nos poços com as amostras.

Por fim, as placas foram submetidas ao ensaio de MTT ($0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e incubadas por 2 horas. Após a incubação, o meio foi cuidadosamente removido e substituído por $100 \mu\text{L}$ de DMSO, seguido de agitação com auxílio de uma multipipeta para dissolução completa dos cristais de formazana formados (insolúveis em meio aquoso) pela metabolização do sal de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio. Essa etapa também contribuiu para o desprendimento celular, a homogeneização da solução em cada poço e a adequada revelação da coloração. Após um período de repouso de 10 minutos, as leituras de absorbância foram realizadas a 570 nm em leitor de microplacas. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição em relação ao controle celular, composto apenas por DMEM completo, representando o crescimento celular sem interferência das amostras.

Figura 10 – Etapas do teste de citotoxicidade e disposição dos extratos secos.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

4.11 Ensaios antimicrobianos

Os ensaios antimicrobianos foram realizados conforme a metodologia descrita por Silva *et al.* (2025) para o crescimento e cultivo dos microorganismos e por Monteiro *et al.* (2024) para o ensaio de atividade, com adaptações, e seguindo a normatização internacional estabelecida pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), conforme o manual M07-A10 (2015), utilizando as cepas *Escherichia coli* (ATCC 11303), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Após o cultivo e ajuste da densidade ótica das suspensões microbianas, foram preparadas diluições seriadas dos extratos obtidos com

diclorometano (DCM) e hexano (HEX), referentes à amostra com maior atividade antioxidantes.

Os extratos foram diluídos na concentração de $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em tampão PBS contendo 8,33% de DMSO como solvente, e as amostras foram esterilizadas em filtro de PTFE de $25 \mu\text{m}$ em câmara de fluxo laminar. Em placas estéreis de 96 poços, foram adicionados $200 \mu\text{L}$ de cada amostra em triplicata, seguidos por $100 \mu\text{L}$ de caldo Mueller-Hinton (M-H). Em seguida, realizou-se a diluição seriada, transferindo $100 \mu\text{L}$ dos poços da primeira coluna para os subsequentes, utilizando movimentos de pipetagem “up and down”, obtendo-se concentrações de 1/2 até 1/128 em relação à amostra inicial.

Após esse preparo, adicionou-se $100 \mu\text{L}$ da suspensão de cada microrganismo em todos os poços e as placas foram incubadas por 18 horas a 37°C . Como controles negativos, foram utilizados o caldo puro, sem adição de amostra ou microrganismo, bem como as amostras diluídas em caldo para verificar possíveis contaminações. Como controle positivo, foram utilizados poços contendo microrganismos e caldo, além de poços com solução de PBS em 8,33% de DMSO nas mesmas concentrações das amostras, para avaliar possíveis interferências do DMSO.

Para ser considerada a Concentração Mínima Inibitória visível (MIC), foram observadas na placa características como turbidez e precipitação bacteriana no fundo do poço, em comparação com o controle negativo (sem bactéria) e o controle positivo (com bactérias). Além da leitura visual, o percentual de inibição foi calculado a partir da densidade óptica (DO) medida a 620 nm em leitor de microplacas (SpectraMax i3x, Molecular Devices). A absorbância da amostra foi subtraída da absorbância do branco (poços contendo amostra e meio, mas sem microrganismo) e valores iguais ou inferiores a 0,09 foram considerados indicativos de inibição.

A percentagem de viabilidade microbiana foi determinada comparando-se os valores com o controle positivo (meio + microrganismos), que foi considerado como 100% de crescimento, conforme descrito na equação 4.6 a seguir.

$$\text{Inibição(\%)} = \left(1 - \frac{\text{ABS da amostra}}{\text{ABS do controle positivo}}\right) \times 100 \quad 4.6$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os DESs produzidos foram selecionados com base em um estudo das misturas eutéticas que demonstraram o melhor desempenho na extração de compostos de matrizes vegetais. A revisão da literatura revelou que misturas eutéticas contendo cloreto de colina (ChCl) como HBA e ácidos láctico e oxálico, bem como 1,2-propanodiol como HBD, apresentaram excelentes resultados na extração de compostos antioxidantes e fenólicos (Bubalo *et al.*, 2016; Leal, *et al.*, 2022; Ueda, 2020; Zhou; Fakayode; Li, 2023). Além disso, foi observado que um DES à base de mentol e ácido láctico poderia se destacar na extração de compostos lipofílicos, como as acetogeninas, devido à sua característica hidrofóbica (Ueda, 2020).

Portanto, esses DESs foram escolhidos para a composição deste trabalho, visando atuar como extratores ativos além do efeito de diluição e difusão de compostos facilmente acessíveis no meio de extração, devido ao pré-tratamento da folha e ao efeito mecânico já provocado pelo método de moagem. Para isso, as características intrínsecas dos DESs produzidos foram investigadas e são apresentadas a seguir.

5.1 Caracterização dos DESs.

Os DESs mencionados na Tabela 2 foram produzidos usando duas diferentes metodologias, devido aos diferentes estados físicos dos seus componentes iniciais. Dependendo dos materiais utilizados, foi observado que a mistura resultante poderia ou não se manter líquida após ser resfriada. A formação de uma mistura homogênea e estável no estado líquido, após o resfriamento, depende, portanto, da temperatura atingida durante a etapa de fusão e homogeneização dos componentes. Ou seja, para garantir que a mistura permaneça líquida, é essencial controlar a temperatura durante o processo de preparação e escolher corretamente os precursores, bem como suas composições molares. (Savi, 2019).

Nesse sentido, para a síntese do DES CCAO a relação molar ideal obtida foi 1:1, com temperatura de produção de 80 °C (Bubalo *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2022; Suresh *et al.*, 2022). Já a combinação molar de 1:2, proposta no método de misturas eutéticas naturais por Dai *et al.* (2013), a 60 °C, não promoveram a formação do DES, mas conduziu à total solidificação da mistura ao final do processo, reiterando a necessidade de maior temperatura e correta combinação molar entre os componentes. Esse comportamento está relacionado às interações entre as moléculas, especialmente aquelas que formam ligações de hidrogênio nos doadores de ligação de hidrogênio (HBDs). Essas interações podem levar ao desenvolvimento de conexões paralelas indesejadas, que desviam a mistura do equilíbrio necessário para manter o ponto

eutético. Assim, as interações extras de ligações de hidrogênio entre os HBDs podem impedir que a mistura atinja o estado ideal de equilíbrio, afetando sua capacidade de se manter homogênea e líquida após o resfriamento.

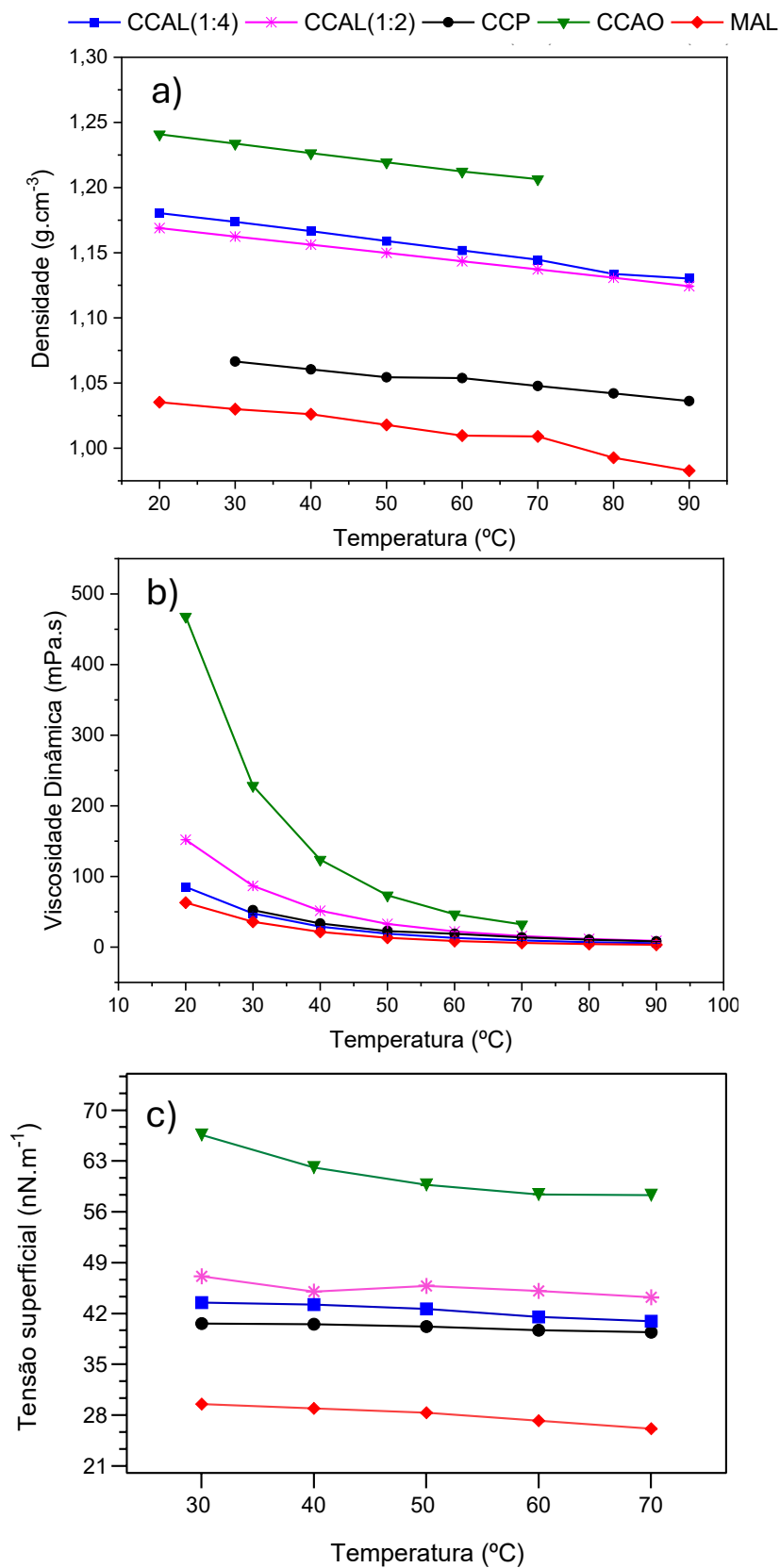
Estudos disponíveis na literatura apontaram que há uma tendência à solidificação quando há presença de moléculas de águas livres no meio e isso intensifica-se com o nível de hidratação dos componentes (Benvenuti; Zielinski; Ferreira, 2019; Dai *et al.*, 2015). Por exemplo, ao utilizar o Cloreto de Colina (ChCl) como HBA, observa-se que o ponto eutético pode ser atingido com concentrações molares mais altas de HBDs monoidratados em comparação com HBDs diidratados. Por isso, para o DES de CCAO, feito a partir de ácido oxálico diidratado, foi necessária a realização de uma segunda preparação com menor concentração molar de HBA e em temperaturas superiores, para garantir uma mistura líquida e impedir a solidificação.

Observação semelhante foi feita com o DES CCP. Inicialmente, a mistura permaneceu homogênea à temperatura ambiente após a preparação, mas após 24 horas de repouso, formaram-se precipitados incolores em formato de agulhas no fundo do recipiente. Esses precipitados se dissolvem completamente quando o sistema é reaquecido a 40 °C, mas reaparecem após o resfriamento e um novo período de repouso de 24 horas. Isso sugere que, na proporção molar de 1:2 entre ChCl e 1,2-propanodiol, há um desequilíbrio que permite a formação desses precipitados. Apesar disso, prosseguiu-se com o uso do CCP nessas condições a fim de comparar com os dados disponíveis em outros trabalhos de extração utilizando o mesmo DES.

Após a preparação, todos os DESs obtidos resultaram em uma mistura incolor e viscosa. As medições de densidade e viscosidade foram realizadas, e os resultados são apresentados na Figura 11. As densidades das misturas (Figura 11-a) seguem o padrão decrescente: CCAO > CCAL (1:4) > CCAL (1:2) > CCP > MAL, independentemente da temperatura. Quanto à viscosidade dinâmica (Figura 11-b) e à tensão superficial (Figura 11-c), o padrão observado foi CCAO > CCAL (1:2) > CCAL (1:4) = CCP > MAL até 50 °C. No entanto, acima dessa temperatura, as amostras, com exceção do CCAO, tendem a apresentar viscosidades semelhantes.

O comportamento de decréscimo nas viscosidades e densidades com o aumento da temperatura era esperado. Porém, foi observado que algumas amostras começaram a mostrar sinais de degradação a temperaturas superiores a 70 °C (especialmente as amostras CCAO e CCAL), enquanto outras amostras (MAL e CCP) apresentaram solidificação em temperaturas abaixo de 30 °C.

Figura 11 – a) Densidade b) Viscosidade dinâmica c) Tensão superficial dos DESs produzidos.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

(*) A densidade foi medida com uma incerteza de $\pm 0,00005 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, a viscosidade foi determinada com uma incerteza de $\pm 0,35\%$, e a tensão superficial foi obtida a partir de 15 medições por ponto, com uma incerteza de $0,01 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, considerando uma variação de temperatura de até $0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ medida externamente.

O CCAO apresenta os maiores valores de viscosidade e densidade em todas as temperaturas, o que era esperado devido à sua composição. A mistura é formada por dois componentes sólidos que se fundem nas condições do ponto eutético caracterizando-se realmente um sólido fundido com aspecto de mel. Além disso, o agente doador possui duas hidroxilas, o que permite a formação de múltiplas ligações de hidrogênio com os íons Cl^{-} do ChCl . Essas interações fortes podem até levar ao emparelhamento das moléculas, resultando em uma mistura altamente densa com muitas ligações intermoleculares. Esse elevado grau de interação dificulta a motilidade do meio, aumentando tanto a viscosidade quanto a densidade da mistura (Dai *et al.*, 2015; Loukri *et al.*, 2022).

Em contraste, o DES à base de mentol apresenta as menores viscosidade e densidade em comparação com as outras misturas, provavelmente devido às fracas ligações de hidrogênio que o formam. No caso do MAL, a ligação mais provável ocorre entre a hidroxila do ácido láctico e a hidroxila do mentol, o que naturalmente requer mais energia, já que interrompe a estabilidade das moléculas e gera uma carga parcial negativa, além de precisar superar possíveis impedimentos estéricos da cadeia carbônica do mentol, o que será posteriormente discutido nos resultados de caracterização química. Essas limitações podem resultar em ligações mais fracas em comparação com os DESs à base de ChCl , onde o receptor é um íon cloreto, altamente eletronegativo e que atrai facilmente o HBD. Apesar dessas indicações, um estudo molecular seria necessário para esclarecer melhor o comportamento das interações intermoleculares dos DESs.

Adicionalmente, os dados de tensão superficial mostrados na Figura 11(c) indicam um leve declínio conforme a temperatura aumenta. Isso sugere que a tensão superficial dos compostos varia pouco, demonstrando alta estabilidade estrutural, mesmo em se tratando de interações relativamente fracas nas misturas eutéticas. No entanto, fora das condições exibidas no gráfico, algumas misturas, como o CCP e o CCAO, mostraram sinais de solidificação abaixo de $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e degradação acima de $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Esses valores representam os limites de estabilidade dessas misturas, indicando as temperaturas nas quais elas mantêm suas propriedades sem alterações significativas.

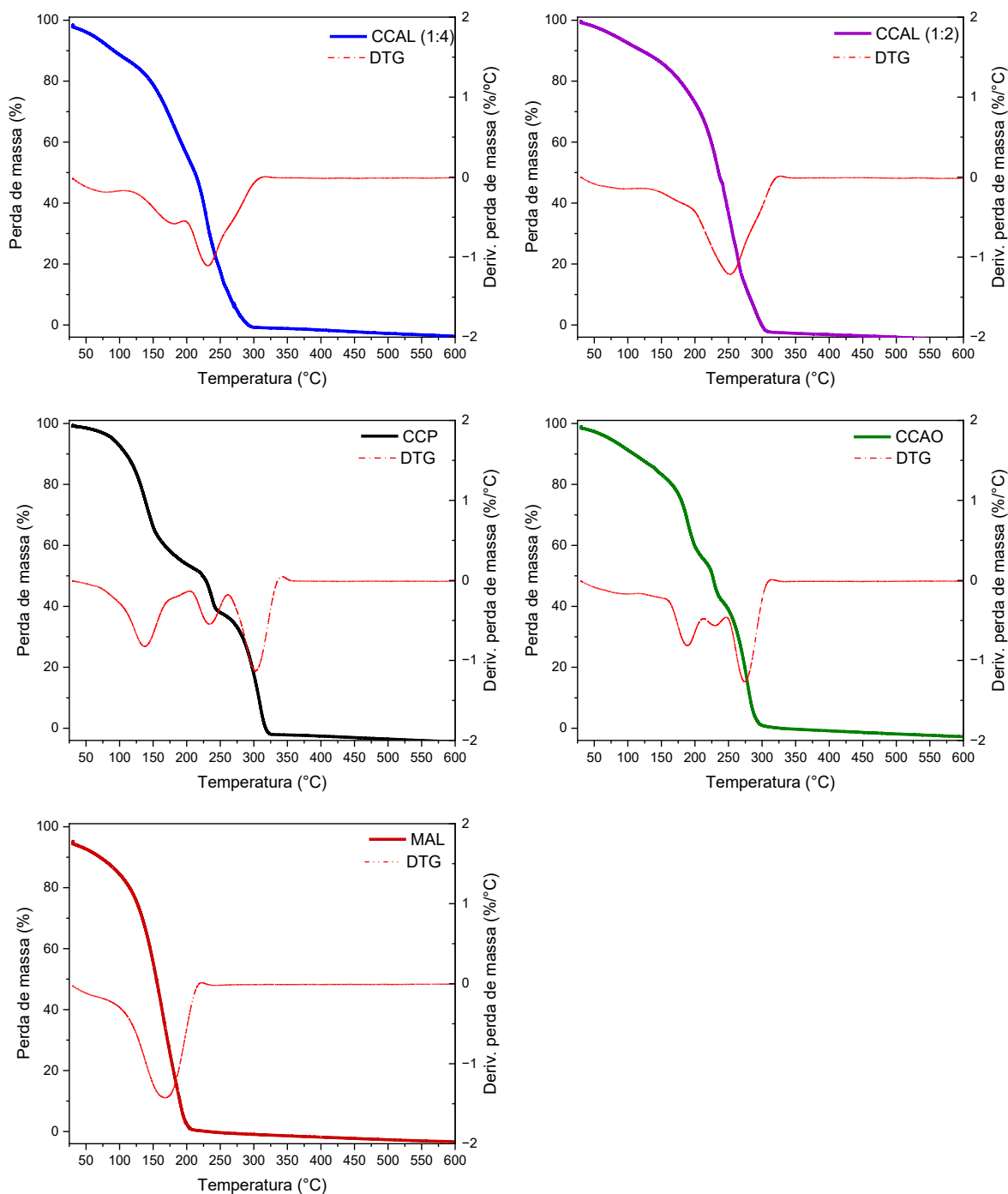
As análises termogravimétricas (TGA) e suas derivadas (DTG) são apresentadas na Figura 12. As curvas obtidas permitiram avaliar o perfil térmico dos DES CCAL (1:4), CCAL (1:2), CCP, CCAO e MAL, identificando etapas distintas de degradação térmica, bem como a estabilidade dos materiais. Em todas as amostras, observou-se uma leve perda de massa inicial abaixo de 100 °C, atribuída à eliminação de água residual, indicando baixa umidade no sistema (Dai *et al.*, 2013). Entre 100 °C e 300 °C, foi identificada uma degradação térmica semelhante em todas as misturas, padrão também descrito na literatura para misturas eutéticas contendo cloreto de colina como HBA (ponto de decomposição entre 180-200 °C) (Souza, 2022).

A literatura aponta que o comportamento térmico dos DES é fortemente influenciado pela natureza dos compostos doadores de hidrogênio (HBDs) presentes (Dias, 2016; Paveglio, 2016). Dessa forma, a decomposição térmica dessas misturas ocorre predominantemente em dois estágios, associados à separação dos componentes individuais (HBA e HBD), devido à ruptura das ligações de hidrogênio que os estabilizam (Marchel *et al.*, 2022). No primeiro estágio, observa-se a volatilização ou decomposição do componente menos estável, geralmente o HBD, que apresenta menor ponto de ebulição. O segundo estágio corresponde à degradação do componente mais estável, tipicamente o HBA, em temperaturas mais elevadas.

Especificamente para a amostra CCAL (1:4), a principal etapa de degradação ocorreu entre aproximadamente 150 °C e 300 °C, com picos na curva DTG em 170 °C e 220 °C, indicando a decomposição inicial do ácido láctico (ponto de decomposição $\approx$ 160 °C), seguida pela degradação do cloreto de colina. Após 350 °C, observou-se estabilização térmica com resíduo sólido remanescente. A amostra CCAL (1:2) demonstrou comportamento semelhante ao da razão 1:4, porém com maior intensidade de perda de massa entre 200 °C e 300 °C. Um único pico de DTG foi observado em 250 °C, sugerindo maior estabilidade térmica e possível sinergismo entre os componentes. A estabilização da massa ocorreu após 300 °C, com menor fração residual em relação à amostra 1:4, o que indica influência da razão molar na estabilidade térmica do sistema.

A amostra CCP apresentou múltiplas etapas de degradação. A primeira perda de massa foi registrada de 60 °C até cerca de 150 °C, seguida por eventos significativos entre 200 °C e 300 °C. A curva DTG revelou dois picos distintos, localizados aproximadamente em 230 °C e 320 °C, sugerindo a presença de compostos com diferentes perfis de decomposição térmica. Isso indica que esta mistura não apresentou sinergismo suficiente para formar um DES estável, mantendo maior separação molecular entre os componentes.

Figura 12- TGAs e DTGs para cada DES produzido.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

De forma semelhante, a amostra CCAO apresentou um perfil com múltiplas transições térmicas. A perda inicial de massa ocorreu em torno de 150 °C, relacionada à eliminação do ácido oxálico (sublimação ≈ 150 °C; decomposição ≈ 189 °C). A principal faixa de degradação foi observada entre 200 °C e 290 °C, com dois picos na DTG em 220 °C e 300 °C. A partir de

400 °C, não foram registradas perdas significativas, indicando degradação quase completa e baixa massa residual.

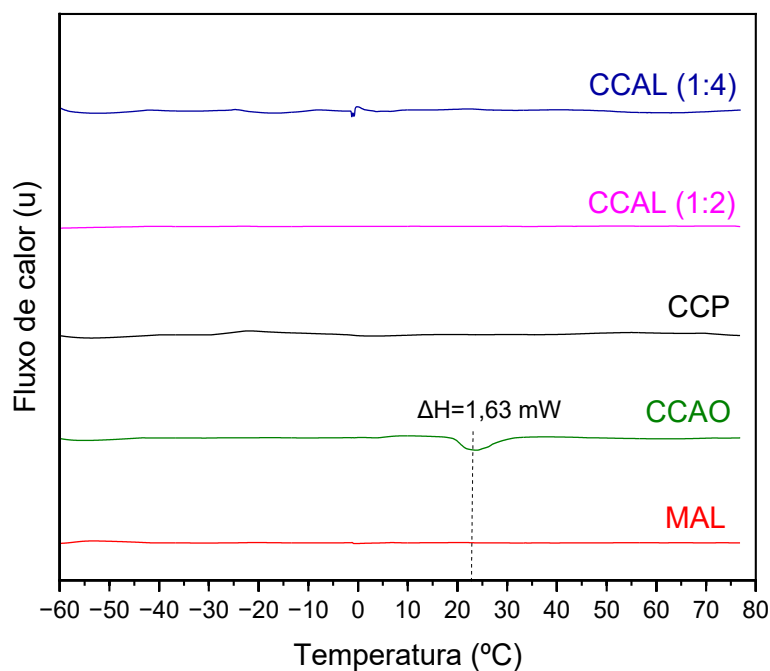
Por fim, a amostra MAL apresentou uma única etapa acentuada de degradação térmica, com perda expressiva de massa entre 50 e 200 °C. O pico máximo de DTG foi registrado por volta de 190 °C, caracterizando um evento dominante de decomposição típico de compostos puros, o que caracteriza essa mistura eutética como estável e bem interligada em termos de interações de pontes de hidrogênio. De forma geral, os perfis térmicos indicam que as amostras analisadas possuem diferentes composições e níveis de estabilidade térmica, refletindo variações na natureza química dos componentes e nas proporções utilizadas.

Conforme estabelecido na literatura, a estabilidade térmica dos DESs está intrinsecamente relacionada à força das interações de hidrogênio, que atuam como barreira energética dificultando a liberação das moléculas individuais - fenômeno que demanda maior energia de decomposição quando comparado aos componentes isolados (Marchel *et al.*, 2022). Este aspecto é particularmente relevante para aplicações em processos de extração, onde a determinação precisa da temperatura máxima operacional é fundamental para evitar degradação prematura do solvente.

Paralelamente aos resultados obtidos por TGA, os dados de calorimetria exploratória diferencial (DSC) apresentados na Figura 13 indicam uma elevada estabilidade térmica das misturas eutéticas produzidas. Assim como relatado por Dai *et al.* (2013), observa-se que os DES analisados comportam-se como complexos supramoleculares com estado líquido estável em uma ampla faixa de temperatura, variando de aproximadamente -50 °C a 100 °C, sem exibir picos característicos de fusão ou ebulição.

A ausência de transições de fase evidentes nas curvas de DSC reforçam a estabilidade estrutural dos DES, conforme também reportado na literatura (Souza, 2022). Apenas a amostra CCAO apresentou uma leve variação no fluxo de calor em torno de 20 °C ($\Delta H = 1,63$ mW), sugerindo a ocorrência de um evento de fusão dos compostos. Esse comportamento é esperado, uma vez que essa mistura é composta por dois sólidos à temperatura ambiente e esta de acordo com os outros DSCs de misturas eutéticas formadas por sólidos já reportados (Cui *et al* 2021; Savi, 2019).

Figura 13-DSC para todos os DES produzidos.

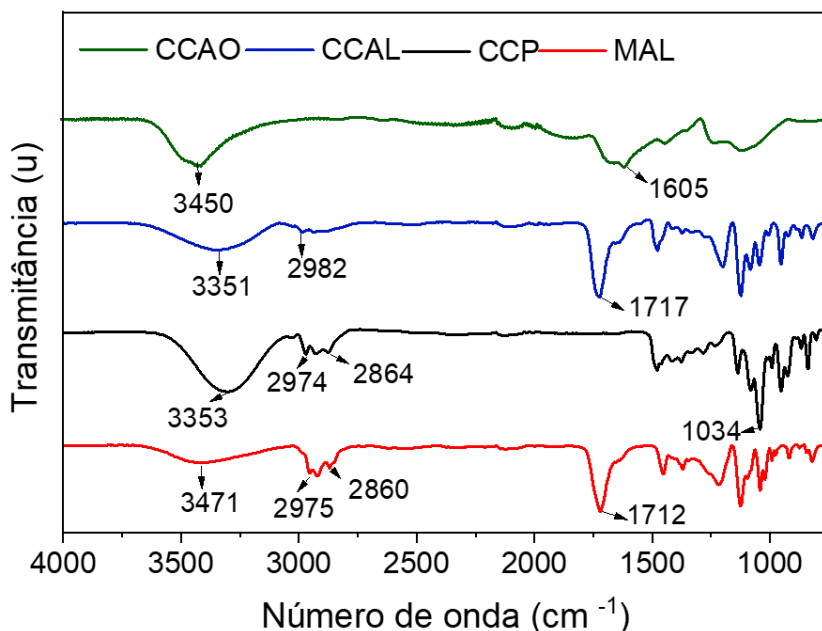


Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Ainda assim, assim como observado nas demais amostras, o resfriamento do sistema não resultou na separação dos componentes iniciais, o que indica que o complexo eutético formado não se trata apenas de uma combinação física transitória, mas sim de uma estrutura supramolecular estável. Dessa forma, mesmo com a identificação de uma transição térmica, a amostra CCAO mantém sua integridade química ao longo da análise.

Quanto à caracterização química, os espectros FTIR (Figura 14) gerados para CCAL (1:4) e CCAL (1:2) apresentaram o mesmo perfil portanto são mostrados somente como CCAL. Os resultados mostram que, em todos os DESs, há a presença do grupo hidroxila, evidenciada pela banda larga correspondente à vibração de estiramento O-H, detectada na região de 3351-3471 cm^{-1} , não suficientemente intensa para indicar água no meio, mas característica dos HBDs (Cui *et al.*, 2021; Kachangoon *et al.*, 2020). Nota-se uma maior intensidade da banda correspondente ao agrupamento O-H em CCP (3353 cm^{-1}), que, juntamente com uma banda estreita e intensa em 1034 cm^{-1} , relacionada à vibração C-N, pode indicar a presença de um excesso de ChCl não reagido na mistura, resultante de um desequilíbrio molar no sistema (Kachangoon *et al.*, 2020).

Figura 14 – Espectros FTIR dos DESs produzidos.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

O conjunto de duas a três bandas observadas na região de 2860-2982 cm^{-1} no espectro infravermelho indica estiramentos dos grupos alifáticos CH_2 e CH_3 , que são características comuns em para a maioria dos DESs. A exceção está no padrão do CCAO, que contém ácido oxálico, o qual apresenta uma diferença devido a presença de carbonos do tipo sp^2 (apresentando uma ligação π - dupla e duas ligações σ - simples) em sua estrutura. Esta conformação conecta os carbonos da cadeia principal a oxigênios e outros carbonos, formando estruturas que interrompem os grupos alifáticos. Isso significa que não há o mesmo tipo de estiramento característico dos grupos CH_2 e CH_3 presentes em outros DESs, e, portanto, para o CCAO o padrão de FTIR difere dos demais devido à ausência de espelhamento dos hidrogênios na estrutura (Zhang *et al.*, 2022).

Já na faixa de 1712-1717 cm^{-1} , tanto para CCAL quanto para MAL, é possível observar a banda correspondente à carbonila ($\text{C}=\text{O}$) do ácido láctico presente nesses dois compostos (Cui *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022). Isso caracteriza a similaridade química entre esses dois DESs mesmo formando interações distintas com dois tipos de HBA, que são o cloreto de colina e o mentol.

Por fim, para CCAO, observa-se uma banda em 1605 cm^{-1} , que pode estar associada à ligação $\text{C}=\text{O}$ do grupo $-\text{COO}$, sobreposta ao grupo H-N do ChCl (Cui *et al.*, 2021). Essas informações indicam que, em cada mistura eutética, as moléculas de HBD e HBA permanecem presentes no meio após a produção, e estão em equilíbrio (estáveis), o que cria as condições

necessárias para a formação dos DESs (Cui *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2019; Paiva *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2022).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) confirmaram a composição de todos os DESs formados e estão alinhados com os dados obtidos por FTIR. Os padrões observados tanto na mistura física quanto nas amostras de DES são consistentes, indicando que a composição original das substâncias permanece intacta na mistura, conforme esperado para um DES. Segundo a literatura, um DES deve manter todos os componentes da mistura eutética, com interações principalmente de ligações de hidrogênio. Portanto, a equivalência entre os espectros da mistura física e do DES formado é um resultado esperado (Delso *et al.*, 2019; Espartero *et al.*, 1996; Panda *et al.*, 2018). Os resultados de RMN, junto com as estruturas dos compostos predecessores e os sinais identificados, estão apresentados na Figura 15.

Os espectros de ^1H -RMN (Figura 15-a) de todos os DESs à base de cloreto de colina apresentaram sinais característicos desse composto em A-3,09 ppm (s, 9H), para o grupo N-N-N-trimetil, e o primeiro tripleto em B-3,39 (t, 2H), característico do grupo alifático CH_2 do ChCl . No entanto, o sinal C esperado para este composto, que representa o tripleto em 3,66-3,64 ppm para OH, não foi observado no espectro de CCP, sendo possivelmente sobreposto por outros sinais do 1,2-propanediol ou simplesmente suprimido devido a condição de instabilidade desse DES. Já para os espectros de ^{13}C (Figura 15-b), todos os DESs contendo cloreto de colina exibem o sinal em 53,6 ppm (A) e em 55,5 ppm (B), mas o terceiro sinal (D) é obtido de maneira ligeiramente distinta, apresentando-se em 66,2 ppm nas misturas de CCAL, como esperado, enquanto para CCP e CCAO ele é deslocado para 67,4-66,6 ppm (DELISO *et al.*, 2019).

Essas diferenças podem estar relacionadas às interações moleculares nas amostras de DESs. No caso do CCP, a não identificação do sinal C no espectro de ^1H sugere que o grupo COH menos impedido estericamente do 1,2-propanodiol pode se dissociar para liberar hidroxilas ou formar subprodutos. Quanto ao CCAO, o deslocamento indica uma maior eletronegatividade com o aumento da distância do grupo em relação ao TMS, resultando em uma condição molecular mais ácida para esse DES, o que será comprovado posteriormente nos dados de pH.

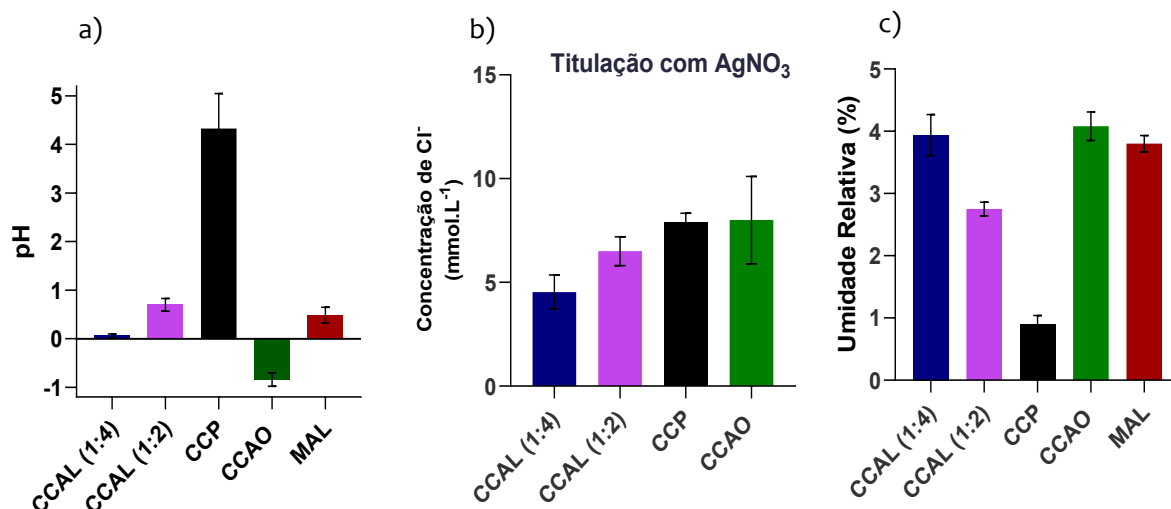
Sobre a presença dos HBDs que formaram as estruturas dos DESs, algumas informações adicionais foram obtidas. Nos espectros de ^1H -RMN (Figura 15-a) dos três DESs contendo ácido láctico (CCAL 1:4, CCAL 1:2 e MAL), foram observados sinais específicos: D= 1,20 ppm (d, 3H) e E= 4,01 ppm (q, 1H), que são característicos desse composto (Suganuma *et al.*, 2012). No entanto, o sinal esperado para o grupo OH, também presente em compostos formados por ácido láctico, não foi identificado. Isso sugere que o grupo OH pode estar interagindo com ligações de hidrogênio do Cloreto de Colina (ChCl) ou do mentol, o que poderia explicar a ausência do sinal esperado para o OH no espectro.

Para o 1,2-propanediol, os espectros de ^1H do CCP mostraram um dubleto em G-0,96 ppm (d, 3H) e os sinais H-3,80 ppm (m, 3H) e I-3,53 ppm (dd, 3H) sobrepostos aos sinais da colina. Nos espectros de ^{13}C do CCP, não houve sinal para o grupo COH do 1,2-propanediol, aparecendo apenas sinais para os outros dois carbonos (G-20,4 ppm e I-67,7 ppm). No caso do CCAO, os espectros são mais simples devido à simetria da molécula, com um único sinal para os hidrogênios em J-4,57 ppm (s, 1H) e para os carbonos em J-161 ppm (Ghorbani-Vaghei *et al.*, 2010).

A molécula de mentol apresenta diversas interações devido à presença do anel cíclico, e essas interações são evidenciadas principalmente no espectro de ^1H . Os sinais vão desde K-0,69 ppm, que corresponde ao singlete de 9H próximo ao grupo metileno, até o duplete de 2H associado ao CH_2 em P-1,61 ppm. No espectro de ^{13}C do MAL, os sinais variam de K-16,91 ppm até P-66,3 ppm, e o grupo CH mais eletronegativo do anel aparece em O-176,69 ppm (Aroso *et al.*, 2016). Esses dados ajudam a caracterizar as interações responsáveis pela formação da mistura eutética no DES, que são mais fracas comparadas às interações nos DESs formados com ChCl.

Outras caracterizações sobre a condição físico-química dos DESs foram realizadas, incluindo a análise do pH das misturas (Figura 16-a). Todos os DESs apresentaram um caráter fortemente ácido, indicando alta corrosividade. Para o caso do MAL, essa acidez pode ser atribuída ao pH do HBD. No entanto, para os DESs à base de ChCl, essa explicação não se aplica, pois, os HBAs utilizados nestas misturas tem um pH de 6,5 a 25 °C, e os predecessores não apresentam o mesmo nível de acidez. Especificamente, o ácido láctico no CCAL e MAL tem um pH de 5,5 (25 °C), o 1,2-propanediol usado no CCP tem um pH de 7,0 (25 °C), e o ácido oxálico tem um pH de cerca de 1,5 (25 °C).

Figura 16 – Caracterização físico-química dos DESs: a) pH das misturas eutéticas a 25°C b) Concentração de íons cloretos detectados por titulação com AgNO_3 e c) Umidade relativa (%).



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

(*) Os valores são apresentados como média $\pm$ DP ($n \geq 2$) para um nível de confiança de 95%.

Mesmo utilizando o ácido oxálico, conhecido por sua alta acidez, os valores de pH obtidos para o CCAO foram surpreendentemente baixos ($\text{pH} = -0,84$). Essa acidez extrema pode ser explicada pelos valores de pK_a do ácido oxálico (apresenta dois pontos de dissociação a 25 °C: $\text{pK}_{a1} \approx 1,23$ e $\text{pK}_{a2} \approx 4,19$), que favorecem a liberação de prótons mesmo em meios pouco aquosos (Kumar; Irfan; Datta, *et al.*, 2019). O mesmo comportamento foi observado em misturas contendo ácido láctico ($\text{pK}_a \approx 3,86$), embora com pH levemente superior (Wardi, *et al.* 2020). Assim, é possível atribuir os baixos valores de pH observados nesses DESs ao caráter ácido dos próprios HBDs utilizados.

Adicionalmente, considerando que a colina está presente como sal de cloreto (ChCl), a possibilidade de liberação de íons Cl^- também foi investigada. Um teste qualitativo com AgNO_3 (Figura 16-b) confirmou sua presença, evidenciada pela formação de um precipitado branco de AgCl . Essa condição possibilita a formação de HCl no meio eutético, especialmente em misturas com elevada dispersão de H^+ . Essa hipótese já foi levantada por Paveglio (2016), que demonstrou a formação de HCl em DES contendo ChCl , a partir da interação com prótons oriundos do HBD.

Assim, a presença de HCl nas misturas pode contribuir para a elevada acidez observada, já que esse composto apresenta pH de $-1,1$ a 25 °C em sua forma sólida e atrelado ao fato de

que os DES são considerados sólidos fundidos, tal condição química favorece a geração de ambientes altamente ácidos, o que ajuda a explicar os baixos valores de pH registrados. (Nordstrom *et al.*, 2000; Yuan; Keane, 2004). No entanto, é importante destacar que esse efeito parece ser secundário nos DES à base de ácido oxálico e ácido lático, em que o pH baixo é mais coerentemente atribuído à acidez intrínseca dos próprios HBDs. Já para a mistura CCP, a influência da liberação de HCl se mostra mais relevante.

Quanto à umidade relativa dos DESs (Figura 16-c), observou-se que, em geral, mesmo os DESs hidrofílicos têm valores abaixo de 5%. O CCP tem a menor porcentagem de umidade relativa (1%), o que pode indicar que nesse sistema ocorre uma supressão significativa das hidroxilas disponíveis no meio impedindo a disposição de água e pode ser uma das razões para a precipitação. Os outros DESs hidrofílicos também apresentam baixa umidade devido às suas composições. No caso do CCAO, a presença de uma única molécula de HBD por HBA reduz a possibilidade de interações paralelas e a liberação de água, o que também é refletido na baixa motilidade dessa mistura verificada nos resultados de densidade e viscosidade. Por fim, o DES hidrofóbico MAL tem a segunda maior umidade relativa, indicando certa tolerância a presença de umidade. Isso também pode ser um fator que influencia na mobilidade das moléculas e reduz a densidade e viscosidade desse DES.

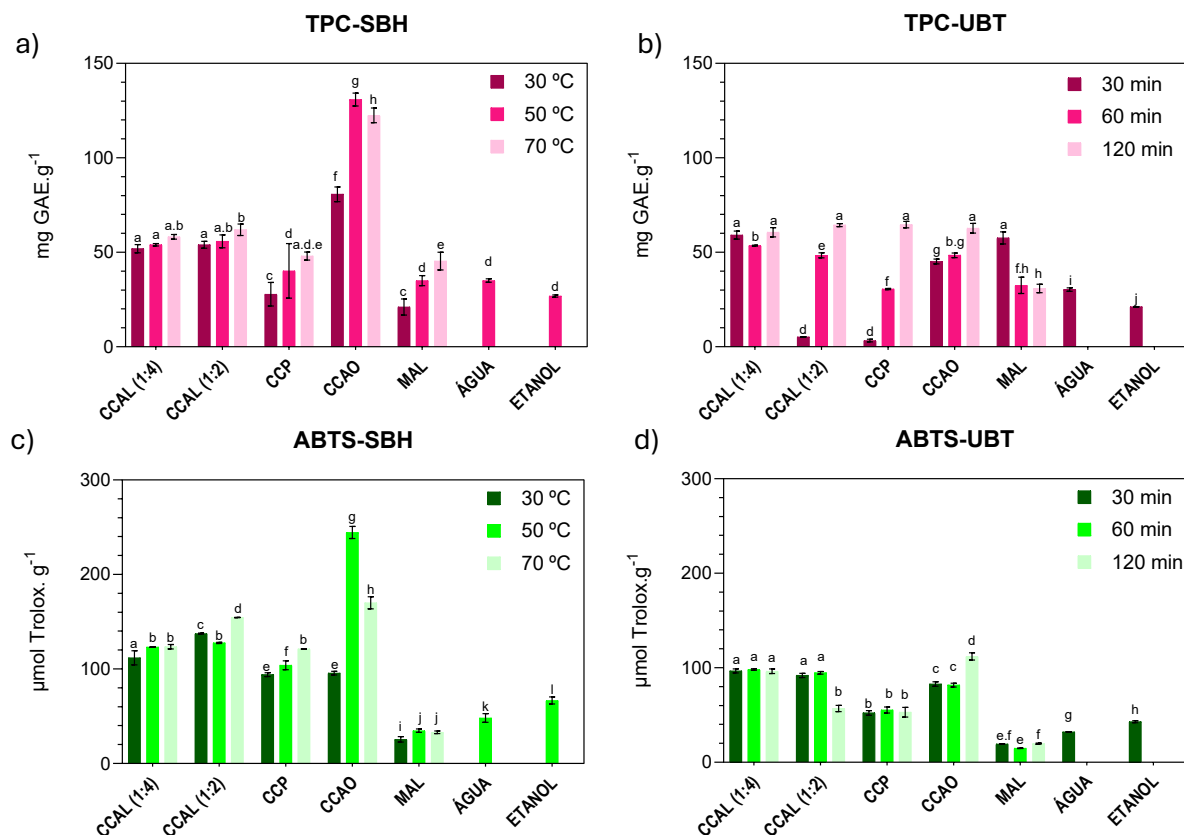
As caracterizações dos DESs não apenas justificam seus desempenhos nos testes de extração, mas também ajudam a explicar os componentes extraídos. Os resultados da extração serão apresentados no próximo tópico.

5.2 Extração de compostos: Caracterização de extrato antes e após recuperação.

i. Atividade antioxidante dos extratos com DESs

Os resultados da atividade antioxidante das amostras, após a extração, estão apresentados na Figura 17. Os dados estão organizados e nomeados de acordo com o solvente eutético utilizado na extração e agrupados quanto à temperatura ou tempo de operação, para os métodos de agitação com banho aquecido (SBH) e banho ultrassônico (UBT), respectivamente. Os valores foram calculados com base numa correlação entre a absorbância medida e a concentração equivalente do antioxidante padrão aplicado em cada tipo de ensaio.

Figura 17 – Atividade antioxidante (*) do extrato de pó de folha de gravioleira com DES como solvente: Fenólicos totais das amostras das extrações a) SBH e b) UBT, e Atividade Antioxidante Total (ABTS) das extrações c) SBH e d) UBT.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

(*) Os valores são apresentados como média $\pm$ DP ($n \geq 2$). A análise estatística foi realizada por ANOVA *two-way*, utilizando o teste de comparações múltiplas de Tukey. Letras iguais indicam que não há diferenças significativas entre os valores para um nível de confiança de 95%.

Os resultados da extração utilizando agitação em banho aquecido (SBH), a sequência de desempenho das amostras, em termos de atividade antioxidante, segue o padrão decrescente: CCAO > CCAL 1:4 = CCAL 1:2 > CCP $\geq$ MAL, tanto nos ensaios antioxidantes TPC (Teor de Compostos Fenólicos Totais) quanto ABTS (atividade antioxidante). O DES CCAO se destaca como o mais eficaz nas extrações, alcançando o ponto ótimo a 50 °C com 244 μ mol de Trolox por grama de pó de folha (μ mol Trolox.g⁻¹) e 130 mg de ácido gálico equivalente por grama de pó de folha (mg GAE.g⁻¹). Esse desempenho superior era esperado, uma vez que o CCAO é o

DES mais ácido entre todos os utilizados, e essa acidez pode ter contribuído para a eficiência na extração de compostos antioxidantes da folha da graviroleira.

Apesar disso, a atividade antioxidante do CCAO em extrações a 30 °C é comparável ou ligeiramente superior à dos outros DESs. Esse comportamento pode ser explicado pela baixa mobilidade do CCAO como solvente que, em baixas temperaturas, enfrenta dificuldades devido à sua alta viscosidade, densidade e tensão superficial, como já foi observado nos ensaios de caracterização. Esses fatores dificultam a extração a temperaturas mais baixas, mesmo com a alta acidez do CCAO e corrobora com as informações apresentadas na literatura, que apontam a elevada viscosidade e densidade como uma das principais desvantagens do uso de DES (Bubalo *et al.*, 2016; Dai *et al.*, 2015; Ueda, 2020). No entanto essa condição se dá somente em temperaturas abaixo de 40 °C, mas em temperaturas em torno de 50 °C o CCAO se destaca como um dos solventes eutéticos de melhor desempenho nas extrações, o que também já foi relatado em outros trabalhos disponíveis na literatura (Bubalo *et al.*, 2016).

Por outro lado, os extratos de CCAL nas proporções 1:2 e 1:4 não alcançam os altos níveis de atividade antioxidante como os observados com o CCAO, mas apresentam resultados consistentes mesmo em diferentes condições operacionais. Esses extratos mostram resultados semelhantes independentemente da temperatura ou do tempo de extração analisado. Isso sugere que estes DESs são relativamente estáveis e não apresentam sinais de degradação, mesmo quando aquecidos a 70 °C, conforme anteriormente indicado pelos dados de tensão superficial, TGA e DSC (Bubalo *et al.*, 2016; Loukri *et al.*, 2022; Shabani *et al.*, 2020).

A 70 °C, os extratos CCAL nas proporções 1:2 e 1:4 apresentaram uma leve melhoria no desempenho, provavelmente devido ao efeito da temperatura, que facilita a extração de compostos de matrizes vegetais. No entanto, a diferença em relação ao ponto ótimo de extração foi mínima, o que não justifica o aumento do gasto energético para obter ganhos adicionais tão pequenos. Além disso, considerando que os compostos de interesse, as acetogeninas, possuem baixa estabilidade em temperaturas superiores a 65 °C, o aumento da temperatura pode resultar em degradação dos mesmos, prejudicando a qualidade do extrato.

Os extratos obtidos com CCP em SBH mostram valores de TPC inferiores às amostras extraídas com CCAO ou CCAL em todo o intervalo de temperatura testado. O comportamento dessa amostra é quase linear, com o conteúdo antioxidante aumentando à medida que a temperatura aumenta, até alcançar valores de ABTS similares aos de CCAL (1:2) a 70 °C. Esses resultados são surpreendentes, considerando que o DES CCP é o menos ácido, com pH em torno de 4-5, mas ainda assim apresenta um desempenho considerável em comparação com seus pares de pH abaixo de 1. Apesar disso, o CCP não apresentou os melhores resultados com

o aumento do tempo de operação, o que pode estar relacionado à presença de material sólido no solvente, resultante da instabilidade provocada pela falha na combinação molar entre ChCL e 1,2-propanodiol. Essa instabilidade originou uma mistura facilmente degradável a cerca de 60 °C, como observado nas análises térmicas (TGA) desse DES.

O DES MAL foi o solvente menos eficiente nas extrações, apresentando apenas um leve aumento nos valores de TPC com o aumento da temperatura, enquanto os valores de ABTS permaneceram constantes. Vale destacar que durante as extrações, notou-se que o solvente começou a volatilizar, emitindo um forte odor característico de mentol. Esse odor foi se intensificando à medida que se aumentou a temperatura de operação, a ponto de a extração a 70 °C ser necessariamente realizada em uma capela de fluxo laminar para garantir a segurança. Por conta disso já seria esperado que os resultados de extração a 70 °C sofressem com o efeito da degradação do DES.

Com base nos dados nota-se que mesmo a característica hidrofóbica desse DES não ajudou na extração de antioxidantes, ao contrário do que foi relatado por Ueda (2020), onde o MAL mostrou alta atividade nas extrações de folhas de uvaia, alcançando valores até três vezes maiores do que os extratos com CCAL. Entretanto, os resultados deste trabalho são semelhantes aos mencionados, no que diz respeito ao melhor desempenho desse DES na extração de compostos detectados pelo método TPC, em comparação com o método ABTS. De fato, no valor de TPC, a extração com MAL apresentou resultados equivalentes aos obtidos com CCP, alcançando 50 mg GAE·g⁻¹ a 70 °C.

Os resultados obtidos pelo método UBT são menos polarizados estatisticamente em comparação ao método SBH, ou seja, os valores de atividade antioxidante nesse caso apresentam pouca variação com aumento do tempo de operação, mantendo-se constante para a maioria dos DESs. Além disso, observou-se que o tempo de extração teve um impacto maior na variação dos fenólicos totais extraídos do que nos compostos antioxidantes. Assim, o ponto ótimo para o método UBT, realizado a 30 °C, em termos de quantidade de compostos antioxidantes, foi alcançado em 30 minutos de operação. Com base nos dados, prolongar o tempo de extração não trouxe resultados significativos no conteúdo antioxidante, exceto para o CCAO, que apresentou um leve aumento com 120 minutos de extração (112 µM de Trolox.g⁻¹). Estes dados conferem com outras otimizações envolvendo o uso do banho ultrassônico em diferentes tempos de operação (Leal, *et al.*, 2022; Ueda, 2020).

Em relação aos resultados de TPC, observou-se que o CCAL 1:4 promoveu uma extração de fenólicos em UBT superior à obtida em SBH, também a 30 °C (60 mg GAE.g⁻¹). Por outro lado, os dados para o CCAL 1:2 e CCP após 30 minutos foram inesperadamente

baixos. Para confirmar esses resultados, a extração foi repetida e os extratos novamente analisados quanto à quantidade de bioativos, revelando o mesmo comportamento. O extrato desses solventes também apresentou uma coloração mais clara, indicando amostras menos carregadas de extrativos em contraste com os extratos dos outros testes.

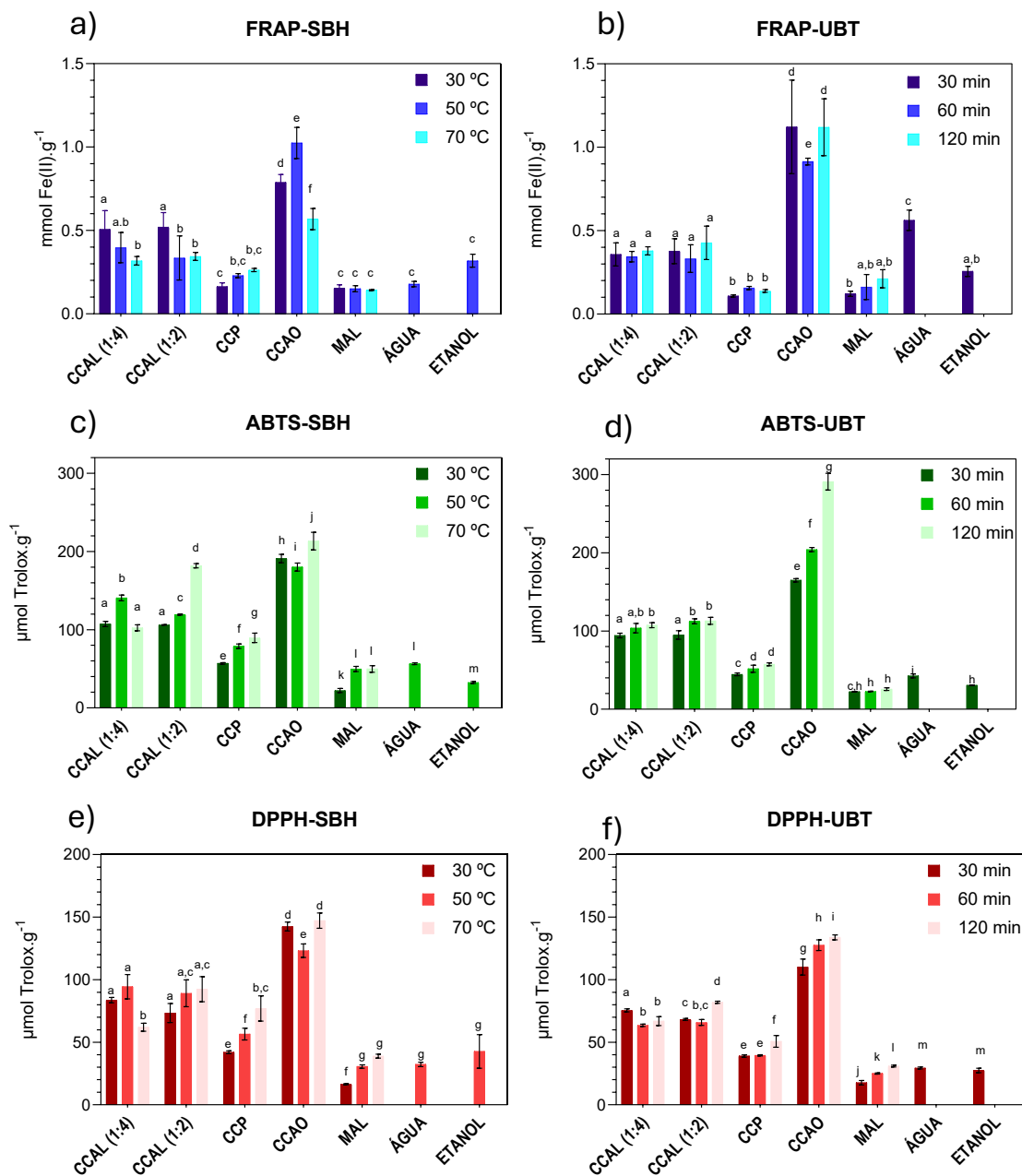
Comparando com os valores de SBH, nota-se que em 30 minutos de extração, sem homogeneização ou controle de temperatura, os níveis de atividade antioxidante são semelhantes aos obtidos em SBH a 30 °C com 120 minutos de operação. Na ausência de homogeneização em maior escala e de aquecimento, destaca-se o papel das propriedades físico-químicas dos DESs no método de extração sólido-líquido.

Com base nestes resultados pode-se apontar que os efeitos fluidodinâmicos, como densidade e viscosidade dos DESs, não são determinantes para a eficiência das extrações. Além desses fatores, é crucial considerar as propriedades físico-químicas dos DESs e os processos isentrópicos e isentálpicos inerentes a essas misturas, a fim de melhorar e otimizar extrações sólido-líquido com DES. Adicionalmente, as características químicas dos DESs podem criar diferentes afinidades com os compostos bioativos, permitindo que sejam projetados para extrair de forma mais eficiente certos grupos de compostos em vez de outros (Lomba *et al.*, 2021; Zhou; Fakayode; Li, 2023).

Os resultados das extrações realizadas por SBH e UBT usando DES como solvente foram comparados com extrações realizadas com água e etanol sob condições ótimas. Observou-se que os DESs apresentaram um desempenho superior, sendo mais eficientes do que os solventes convencionais nessas condições. Esses achados estão em concordância com outros estudos relatados na literatura. (Bubalo *et al.*, 2016; Loukri *et al.*, 2022).

Após o período de armazenamento sob refrigeração a -18 °C, os extratos foram reavaliados quanto à atividade antioxidante, conforme apresentado na Figura 18. As amostras apresentaram variação, seguindo a ordem de atividade antioxidante decrescente: CCAO > CCAL 1:4 ≥ CCAL 1:2 > CCP > MAL, considerando as condições ótimas de cada método de extração. Nos novos resultados, a variação da temperatura ou do tempo de extração mostrou pouca ou nenhuma influência na capacidade antioxidante da maioria das amostras. Em vez disso, as características específicas de cada DES utilizado nas extrações, especialmente a acidez, mostraram-se justificativas mais plausíveis.

Figura 18 – Capacidade antioxidante (*) das amostras de extrato em meio a DES após armazenamento. Valores para SBH a) FRAP c) ABTS e d) DPPH. Valores para UBT b) FRAP d) ABTS e f) DPPH.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

(*) Os valores são apresentados como média $\pm$ DP ($n \geq 3$). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA two-way de Tukey. Os valores foram comparados para verificar semelhanças dentro de um mesmo DES em diferentes condições de temperatura ou tempo de extração, e

entre os diferentes DESs sob as mesmas condições operacionais de extração. Letras idênticas indicam que não há diferenças significativas entre os valores, considerando um nível de confiança de no mínimo 95%

Assim, no caso dos extratos contendo CCAO, verificou-se uma maior polarização e discrepância dos valores em relação as outras amostras, alcançando uma capacidade antioxidante de até 291 μmol de Trolox. g^{-1} na extração UBT com 120 minutos de operação e 213 μmol de Trolox. g^{-1} na extração SBH a 70 °C. Essa diferença pode estar relacionada ao desgaste das fibras da biomassa causado pelo ultrassom. Nesse caso, como a filtração feita depois da extração não reteve totalmente as partículas menores, o contato prolongado desse material com o DES ácido pode ter contribuído para continuar a extração dos compostos bioativos durante o armazenamento. No entanto, a literatura aponta que a principal razão para a melhora nos resultados pode estar relacionada ao aumento da estabilidade das biomoléculas quando armazenadas em DES de caráter ácido. Como o ácido oxálico é conhecido por estabilizar compostos fenólicos, essa condição favoreceria uma melhor resposta nos testes antioxidantes após o período de armazenamento. (Altunkaya; Gökmen, 2008) .

As amostras extraídas com CCAL 1.2 e CPP apresentaram valores muito semelhantes, inclusive nas amostras de UBT a 30 °C, onde a atividade antioxidante era praticamente inexistente, conforme as análises realizadas até 48 horas após a extração. Os extratos obtidos com MAL, água e etanol mantiveram as menores capacidades antioxidantes, com valores próximos aos observados inicialmente, apesar de uma leve variação positiva nas extrações com ultrassom entre 60 e 120 minutos, e uma possível degradação nos extratos de etanol. Esses resultados podem não ser muito significativos, considerando os erros operacionais, que podem ter influenciado na capacidade de detecção das técnicas, e as diferenças entre os equipamentos utilizados nas análises.

ii. Caracterização de extrativos totais por métodos exaustivos

Os solventes convencionais também foram usados para extrair compostos bioativos das folhas de graviroleira, com o objetivo de avaliar a quantidade total de extrativos em processos mais intensivos e prolongados (Tabela 6). O primeiro método, Soxhlet (SOX) com metanol, obteve uma quantidade total de extrativos de 24,31% $\pm$ 1,32 (DP) da massa inicial (calculada pela diferença gravimétrica). Os extratos obtidos apresentaram uma atividade antioxidante total

de 434,05 μM de Trolox por grama e um Conteúdo Total de Fenólicos de 107,69 mg de ácido gálico por grama.

A fim de comparar com outros métodos mencionados na literatura, foram realizados dois procedimentos: o método de extração Soxhlet utilizando etanol como solvente por 5 horas e o método de agitação com Mixer por 15 minutos, empregando uma mistura 50/50 (v/v) de água e etanol (Moraes *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2022). Os resultados de compostos fenólicos obtidos diferem dos resultados da literatura apresentando um valor inferior quanto à atividade antioxidante (em torno de 50%) e TPC, em média, 0,11% GAE. g^{-1} . Esse resultado pode ser atribuído ao estado de maturação acelerado das folhas, causado pelo calor ambiente durante o armazenamento inicial (Balderrama-Carmona *et al.*, 2020; Moraes *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2022).

Tabela 6 – Extrativos totais via atividade antioxidante de extratos secos obtidos por extração exaustiva Soxhlet e Mixer.

ANÁLISES	Soxhlet/ Metanol (1:10 m/v; 24 h)	Soxhlet/ Etanol (1:10 m/v; 5 h)	Mixer/ Etanol 50% (v/v) (15 m; 50 °C; 1:20 m/v)
ABTS* (μM Trolox. g^{-1} , <i>d.b.</i>)	434,05 $\pm$ 5,09	483,50 $\pm$ 3,01	419,75 $\pm$ 3,59
TPC** (μg GAE. g^{-1} , <i>d.b.</i>)	107,69 $\pm$ 4,06	127,29 $\pm$ 2,87	104,71 $\pm$ 15,28

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

(*) Determinado pelo método de estimativa de atividade antioxidante pela captura do radical ABTS (cubetas).

(**) Determinado pelo método de quantificação de fenólicos totais.

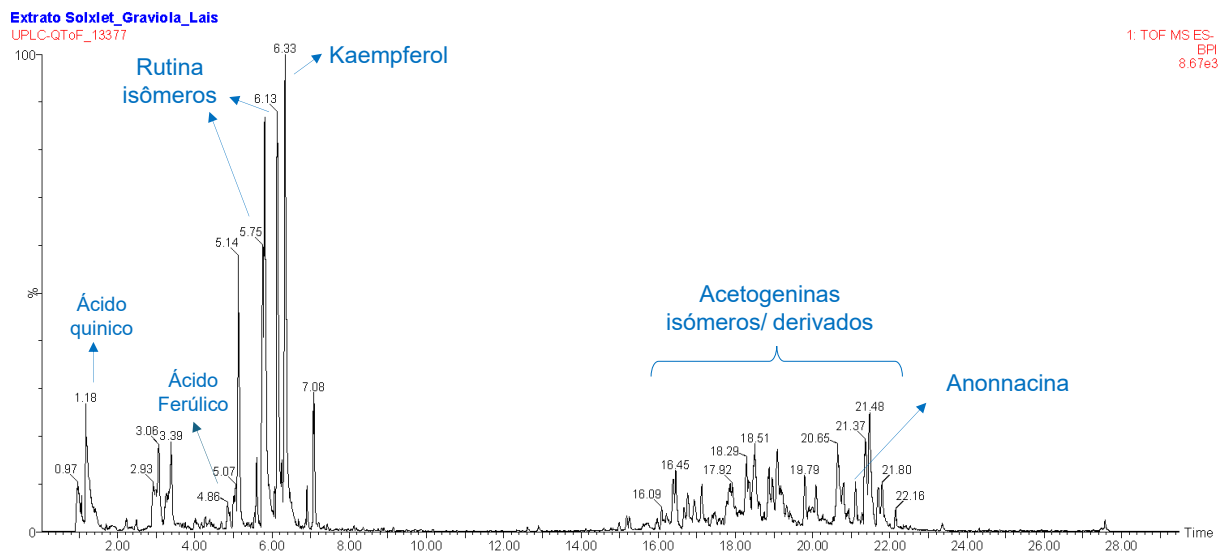
d.b. - biomassa seca (*dry-biomass*)

A análise das substâncias bioativas no extrato obtido por Soxhlet/metanol foi feita por cromatografia UPLC (Figura 19), e a descrição dos picos encontrados está na Tabela 6. Foram identificados vários metabolitos secundários, incluindo ácido quínico (1,18 min), ácido ferúlico (4,7 min), rutina (5,75 min) e kaempferol (6,33 min), conforme esperado para uma extração de material vegetal (Carvalho *et al.*, 2022; Luiza Koop *et al.*, 2022).

Além disso, foi encontrado um grupo de moléculas com uma longa cadeia de carbono, C35, na faixa de tempo de retenção de 16,9 a 22,6 minutos. Nesta faixa, foram identificados vários isômeros de acetogeninas, incluindo a anonacina ($\text{C}_{35}\text{H}_{64}\text{O}_7$). Essas substâncias são

típicas de plantas do gênero *Annona* e são valorizadas por seu potencial no tratamento de células cancerígenas (Mokhtar *et al.*, 2022; Moraes *et al.*, 2018; Poyer *et al.*, 2022).

Figura 19 – Cromatograma do extrato seco gerado a partir da extração metanólica em soxhlet.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Tabela 7 – Identificação do cromatograma UPCL gerado a partir do extrato metanólico do pó de folha de gravioleira.

Picos no.	Rt ^a (min)	[M-H] ⁻ Observado ^b	[M-H] ⁻ Calculado	Íons (MS/MS ^c)	Fórmula Molecular	Erro (Ppm) ^d	Nomenclatura ^e	Referências
1	1,18	191,0547	191,0556	173	C ₇ H ₁₂ O ₆	-4,7	Ácido Quínico*	(Carvalho <i>et al.</i> , 2022; Souza O. <i>et al.</i> , 2022)
2	3,06	315,0710	315,0716	152	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	-1,9	Desconhecido	(Song <i>et al.</i> , 2021)
3	4,18	163,039	163,0395	119	C ₉ H ₈ O ₃	-3,7	Ácido cumárico*	(Carvalho <i>et al.</i> , 2022)
4	4,54	577,135	577,1346	425, 407, 289	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	0,7	Procianidina B (Dímero)*	(Carvalho <i>et al.</i> , 2022)
5	4,76	193,0497	193,0501	179, 149	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	-2,1	Ácido Ferúlico*	(Carvalho <i>et al.</i> , 2022)
6	4,92	289,0702	289,0712	245, 203	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	-3,5	Catequina*	(Carvalho <i>et al.</i> , 2022)
7	5,06	293,0872	293,0873	147, 165	C ₁₁ H ₁₈ O ₉	-0,3	Dihidrojasmona	(Allen; Greiner; Wishart, 2015)
8	5,14	415,1225	415,1240	221, 239, 203	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₁	-3,6	Desconhecido	(Allen; Greiner; Wishart, 2015)
9	5,75	609,1437	609,1456	463, 301	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	-3,1	Rutina*	(El Sayed <i>et al.</i> , 2020; Song <i>et al.</i> , 2021)
10	5,81	609,148	609,1456	463, 301	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	3,4	Rutina (isômero)	(El Sayed <i>et al.</i> , 2020; Song <i>et al.</i> , 2021)
11	6,13	593,1495	593,1506	447, 285, 255	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	1,9	Kaempferol-O-hexosil-O-ramnosídeo (isômero)	(Carvalho <i>et al.</i> , 2022)
12	6,33	593,1509	593,1506	447, 285, 255	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	0,5	Kaempferol-O-hexosil-O-ramnosídeo (isômero)	(El Sayed <i>et al.</i> , 2020; Song <i>et al.</i> , 2021)
13	6,61	447,0912	447,0927	285, 255	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-3,4	Kaempferol-O-hexosil-O-ramnosídeo	(Silveira <i>et al.</i> , 2018; Song <i>et al.</i> , 2021)
14	7,08	517,2274	517,2285	499, 487, 221, 205	C ₂₄ H ₃₈ O ₁₂	-2,1	Desconhecido	(Allen; Greiner; Wishart, 2015)
15	16,09	277,2176	277,2168	253, 183, 112,	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	2,9	Desconhecido	(Allen; Greiner; Wishart, 2015)

16	16,45	277,2163	277,2168	253	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	-1,8	Desconhecido	(Allen; Greiner; Wishart, 2015)
17	18,29	611,4493	611,4523	575, 371, 353, 285	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	-4,9	Annopentocina C (isômero)	(Allen; Greiner; Wishart, 2015)
18	18,51	611,4520	611,4523	575, 371, 353, 285	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	-0,5	Annopentocina C	(Allen; Greiner; Wishart, 2015)
19	18,75	611,4545	611,4523	575, 371, 353, 285	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	3,6	Annopentocina C (isômero)	(Allen; Greiner; Wishart, 2015)
20	19,79	609,4355	609,4366	591, 439, 421, 437	C ₃₅ H ₆₂ O ₈	-1,8	Annonisina	(Allen; Greiner; Wishart, 2015)
21	20,65	595,4562	595,4574	551, 483, 471, 343	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	-2,0	Annonacina (isômero)	(Allegrand <i>et al.</i> , 2010; Carvalho <i>et al.</i> , 2022 Souza O. <i>et al.</i> , 2022)
22	21,37	595,4580	595,4574	551, 483, 471, 343	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	1,0	Annonacina (isômero)	(Allegrand <i>et al.</i> , 2010; Carvalho <i>et al.</i> , 2022 Souza O. <i>et al.</i> , 2022)
23	21,48	595,4577	595,4574	551, 483, 471, 343	C₃₅H₆₄O₇	0,5	Annonacina	(Allegrand <i>et al.</i> , 2010; Carvalho <i>et al.</i> , 2022 Souza O. <i>et al.</i> , 2022)
24	21,80	595,4585	595,4574	551, 483, 471, 343	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	1,8	Annonacina (isômero)	(Allegrand <i>et al.</i> , 2010; Carvalho <i>et al.</i> , 2022 Souza O. <i>et al.</i> , 2022)

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

^a, Tempo de retenção. ^b, Massa da molécula observada menos um próton. ^c, Íon observado na análise. ^d, Erro de massa em ppm entre o valor calculado e o observado. ^e, Nomenclatura do composto.

^{*}, comparado com o padrão autêntico.

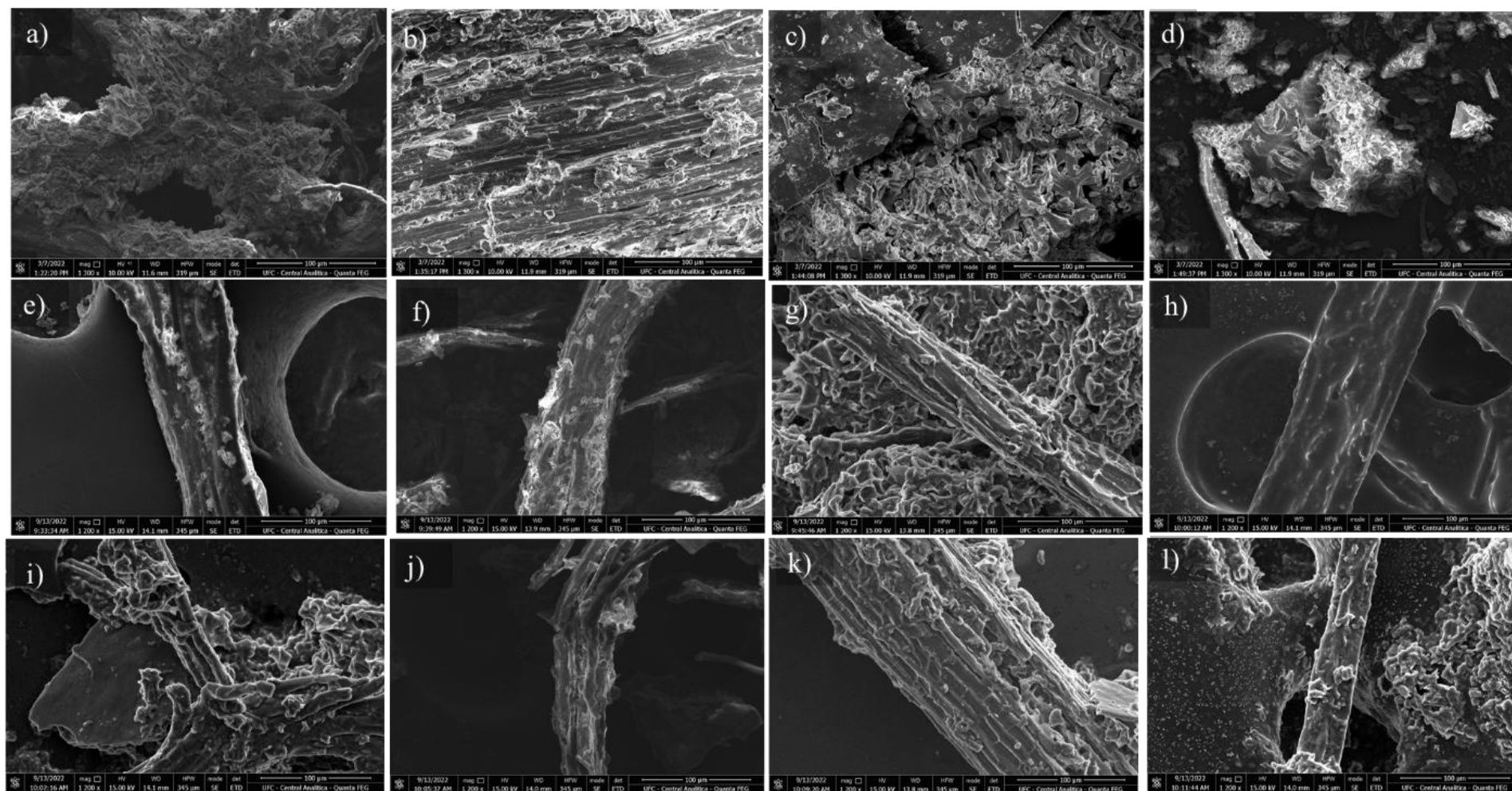
A biomassa remanescente, filtrada ou seca, de cada um dos procedimentos mencionados foi analisada quanto à sua morfologia, com o objetivo de comparar o desgaste aparente e superficial sofrido em cada processo de extração. As imagens de MEV na Figura 20 mostram o resultado da moagem e o estado inicial do pó das folhas, seguidos do material obtido após as extrações. Nas imagens das amostras antes da extração, observa-se uma morfologia rugosa, com aglomerados de partículas menores espalhadas por toda a superfície.

Adicionalmente, como esperado o tamanho das partículas diminui conforme o aumento do número de aberturas das peneiras por área (mesh). Entretanto, nas amostras com partículas menores que 32 mesh (Figuras 17 (c) e (d)), observa-se aglomeração e uma provável aderência entre as partículas, devido ao próprio óleo essencial da folha que é liberado nas etapas de secagem e moagem.

Quanto à morfologia final da biomassa, observa-se a extração com Soxhlet e MAL não causou mudanças significativas na amostra em comparação com o estado inicial. Por outro lado, as amostras extraídas com CCAL e CCP nos procedimentos SBH e UBT apresentam uma maior quantidade de fissuras na estrutura das fibras, indicando um desgaste mais acentuado. Além disso, a amostra extraída com CCAL pelo método UBT destacou-se por sua grande rugosidade. Em contraste, a amostra tratada com CCP no mesmo método apresentou uma grande quantidade de material particulado em forma de grãos, sugerindo a presença de um ou mais compostos provenientes do DES CCP.

Finalmente, a amostra tratada com CCAO, e pela qual os extratos tiveram a maior concentração de bioativos é também a amostra cuja superfície é mais desgastada e polida. O tratamento com DES nesse caso significa uma participação ativa no processo, através de uma interação direta com a superfície da amostra fornecendo desgaste, que pode favorecer a obtenção de extrativos ainda localizados na parte interna da biomassa. Assim, o uso desse tipo de solvente dispensa a necessidade de empregar altas temperaturas ou agitação vigorosa, pelo fato de não somente facilitar a difusão dos compostos através dos poros criados pelo pré-tratamento da biomassa, mas também desempenha um papel ativo ao garantir a abertura desses canais, rompendo as fibras vegetais mesmo em condições de operação mais brandas.

Figura 20 – MEV do pó da folha de graviola a) 18 mesh, b) 32 mesh, c) 64 mesh, d) Partículas menores do que 64 mesh, e) Biomassa antes da extração. Após a extração: f) Soxhlet 24 horas, g) SBH com CCAL 1:4, h) SBH com CCAO, i) SBH com CCP, j) SBH com MAL, k) UBT com CCAL 1:4 e l) UBT CCP.

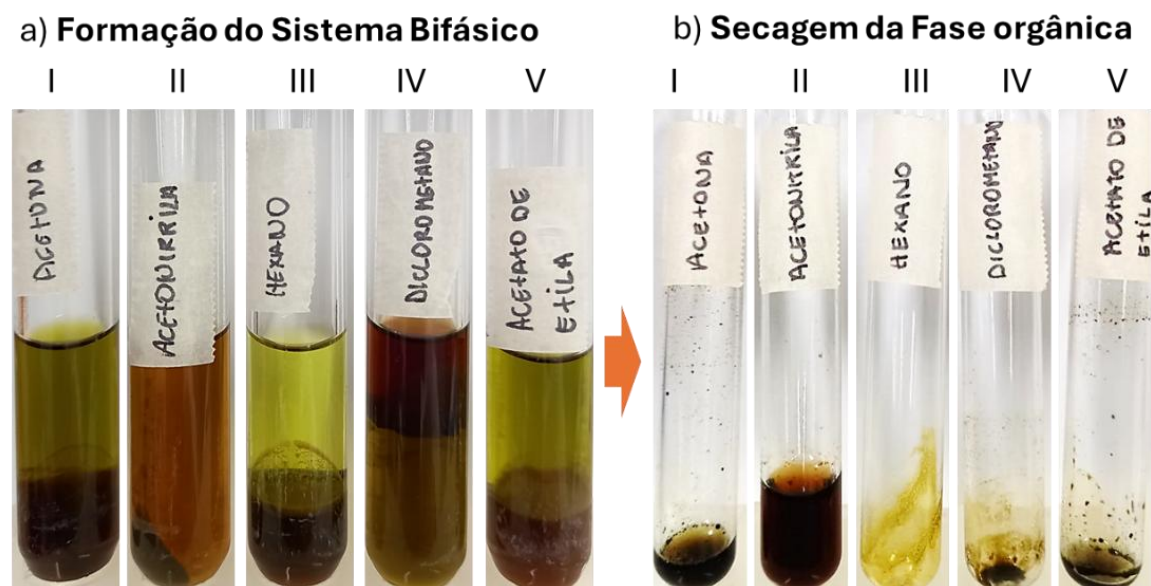


Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

iii. Estratégia de Recuperação por Separação Líquido-Líquido

Os extratos com melhor capacidade antioxidante, a saber os extratos obtidos com CCAO e CCAL 1:4 nas extrações a 50 °C/120 min por SBH e 35°C/30 min por UBT, foram submetidos a um procedimento de separação utilizando diferentes solventes voláteis (Figura 21). Esse procedimento foi necessário para remover os extrativos do meio com DES, a fim de realizar as análises de citotoxicidade e atividade antimicrobiana que serão exploradas nos tópicos subsequentes. Para realizar essa estratégia de recuperação, inicialmente, os solventes orgânicos voláteis foram testados, mas nem todos formaram um sistema bifásico (Figura 21 (a)) com as misturas DES-extrativos. A acetonitrila foi o primeiro solvente a ser descartado por apresentar total miscibilidade com a amostra e não ser capaz de produzir o sistema bifásico.

Figura 21 – Separação Líquido-Líquido com diferentes solventes voláteis: I-Acetona, II-Acetonitrila, III-Hexano, IV-Diclorometano, V-Acetato de Etila. a) Sistemas bifásicos entre as amostras de DES-Extrativos (*). b) Resultado após secagem da fase recuperada com solvente volátil (**).



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

(*) A amostra testada na imagem é mistura de extrativos com CCAL 1:4 (50 °C/120 min). Todas as outras amostras obtidas com CCAO nas mesmas condições, assim como as amostras obtidas com CCAL 1:4 e CCAO por UBT (35°C/30 min), apresentaram comportamento similar.

(**)A operação de secagem foi realizada até não haver variação significativa da massa do recipiente. O valor referente ao peso dos extrativos foi dado como a diferença gravimétrica dos tubos.

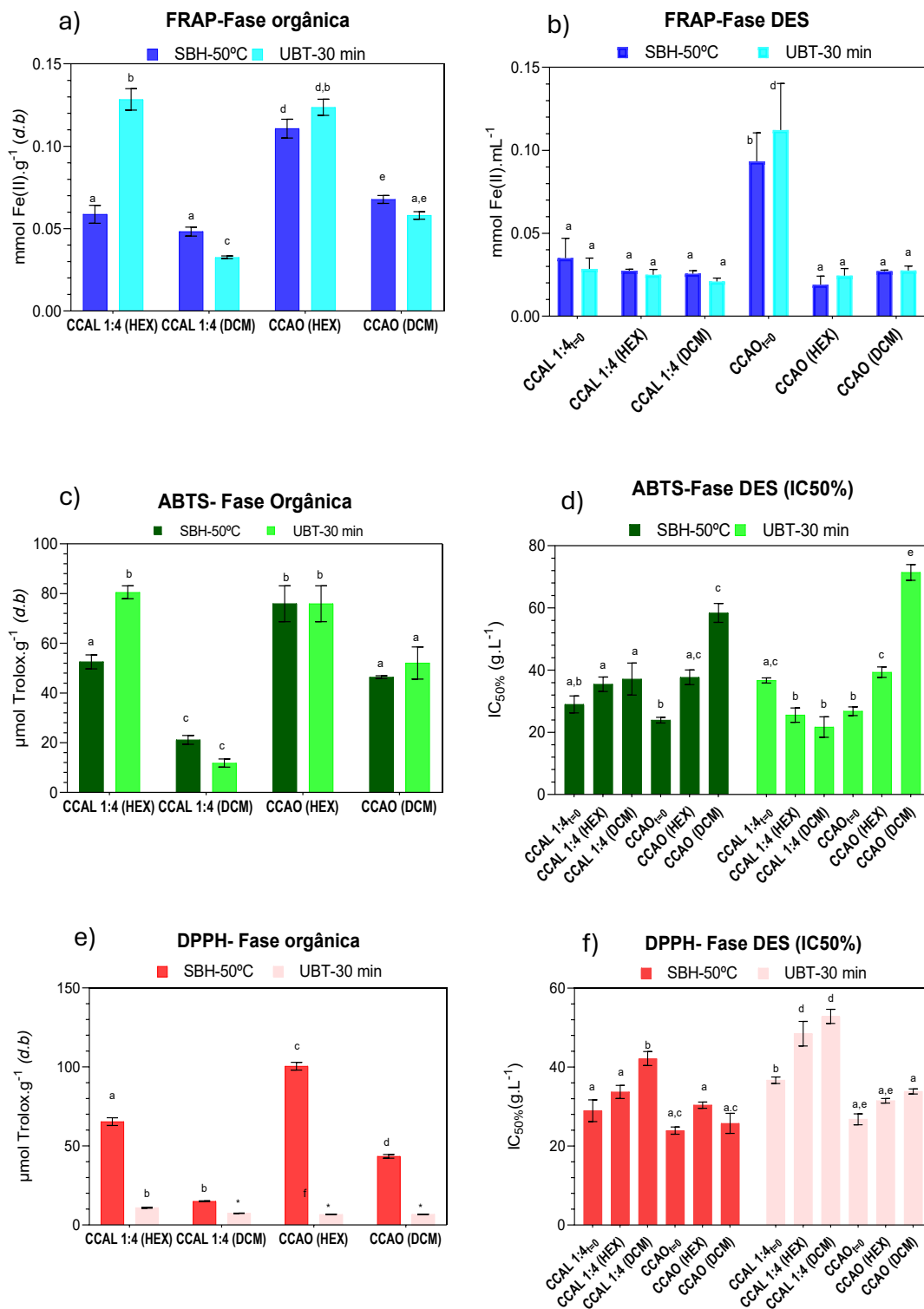
Posteriormente as fases orgânicas, contendo os solventes voláteis, foram separadas dos sistemas bifásicos e secas por evaporação utilizando nitrogênio gasoso. Ao término da secagem (Figura 21 b), apenas as amostras separadas com hexano e diclorometano apresentaram-se visualmente secas, com uma biomassa oleosa aderida ao fundo dos tubos. Nos demais tubos, onde a separação foi realizada com acetona e acetato de etila, foi constatada a presença de uma substância viscosa, semelhante aos DESs. Esse comportamento sugere que, nesses casos, ocorreu uma maior diluição dos DESs na fase orgânica, sendo a polaridade dos solventes um fator determinante na miscibilidade dos solventes voláteis.

A ordem de polaridade, baseada no momento dipolar (D), é: Acetonitrila > Acetona > Acetato de Etila > Diclorometano > Hexano. Assim, considerando que os DESs são misturas altamente polares devido à presença de íons Cl⁻, é provável que apresentem maior afinidade com solventes polares e menos interação com solventes apolares, como o Diclorometano (DCM-1,6 D) e o Hexano (HEX-0,08 D), possibilitando a formação de sistemas bifásicos com maior grau de imiscibilidade (Wang *et al.*, 2017).

As amostras dos sistemas bifásico obtidas após a secagem foram avaliadas quanto à atividade antioxidante. Os tubos que apresentaram uma mistura viscosa semelhante ao DES na fase de recuperação foram descartados, uma vez que não puderam ser analisadas devido às diferentes colorações, que estavam fora da faixa colorimétrica esperada para cada ensaio, além do elevado nível de turbidez formado quando em contato com os radicais FRAP, DPPH e ABTS. A análise da atividade antioxidante prosseguiu apenas com as amostras recuperadas com diclorometano e hexano, tanto para a fase orgânica quanto para a fase remanescente (fase DES), cujos resultados estão apresentados na Figura 22.

Os resultados de atividade antioxidante da fase orgânica mostraram que foi possível detectar material recuperado do meio contendo DES, utilizando a técnica de formação de sistema bifásico com solventes orgânicos (Figura 22-a). Os dados indicam ainda que as amostras originárias do método SBH e UBT tiveram desempenho semelhante na recuperação de material antioxidante via ABTS (Figuras 22 c). A exceção foi a amostra extraída por UBT com o solvente CCAL 1:4, seguida da separação por hexano (CCAL 1:4 (HEX)), que apresentou valores mais altos nas análises ABTS e FRAP. Além disso, as amostras recuperadas com HEX mostraram uma capacidade antioxidante maior do que aquelas recuperadas com DCM em todas as análises provavelmente devido a seletividade a compostos lipofílicos em cada tipo de solvente.

Figura 22 – Atividade antioxidante (*) dos extratos da fase orgânica (**) obtidos por separação líquido-líquido: a) FRAP. c) ABTS. e) DPPH. Atividade antioxidante das amostras da fase DES (**): b) FRAP. d) IC50 % (ABTS) e f) IC50% (DPPH).



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

(*) A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA two-way de Tukey. (*) Os valores são apresentados como média $\pm$ DP ($n \geq 2$). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA two-way de Tukey. Os valores foram comparados para verificar semelhanças dentro de um mesmo DES em diferentes condições de temperatura ou tempo de extração, e entre os diferentes DESs sob as mesmas condições operacionais de extração. Letras idênticas indicam que não há diferenças significativas entre os valores, considerando um nível de confiança de no mínimo 95%.

(**) Fase orgânica: fase recuperada por solvente orgânico Hexano (HEX) ou Diclorometano (DCM).

(***) Fase DES: fase contendo DES e antioxidantes remanescentes.

Em suma, o melhor desempenho dos extratos obtidos com hexano, em comparação com os recuperados com diclorometano, pode ser atribuído à natureza apolar do hexano, que o torna mais eficiente na miscibilidade de compostos lipofílicos, como terpenos, flavonoides lipofílicos e ácidos graxos, componentes frequentemente encontrados em óleos essenciais e em extratos vegetais apolares, foram detectados nas amostras analisadas. (Jacobsen *et al.*, 2024; Nawaz *et al.*, 2020). O diclorometano, por sua vez, é um solvente mais polar e tende a recuperar compostos fitoquímicos fenólicos e flavonoides hidrossolúveis, que, embora também tenham atividade antioxidantes, podem estar em menor quantidade e não ser tão bem identificáveis pelas técnicas de ABTS DPPH E FRAP utilizadas.

Isso não indica que os extratos obtidos na fase com hexano sejam superiores, mas que podem ser empregados em funções distintas, uma vez que a literatura indica que os extratos com diclorometano também possuem propriedades farmacológicas valiosas, frequentemente associadas a compostos com atividade redutora e capacidade de sequestro de radicais livres (Nawaz *et al.*, 2020).

Ainda com relação à fase orgânica, dos resultados de DPPH (Figura 22-e) observou-se que as amostras originárias da extração UBT não alcançaram 50% de inibição nas análises mesmo em testes com as concentrações máximas possíveis por material recuperado, apresentando então atividades baixas e não coerentes com os valores observados em ABTS para as mesmas amostras. É importante ressaltar, que as quantidades de material recuperado das amostras obtidas pelo método UBT foram inferiores às das amostras extraídas por SBH. Isso pode ter provocado uma variação relacionada à concentração das amostras originárias do método UBT, impactado nos valores finais de capacidade antioxidante.

Na fase remanescente de DES (Figura 22- b, d, f), a atividade antioxidante das amostras tratadas com CCAL 1:4, tanto com HEX quanto com DCM, foi similar à das amostras originais não tratadas (CCAL 1:2 $t=0$). Isto sugere que os solventes utilizados não contribuíram com diferenças significativas na remoção de compostos. Por outro lado, nas amostras tratadas com CCAO, houve uma grande variação nos resultados gerados, indicando que uma quantidade significativa de material foi recuperada, o que é consistente com os valores observados na fase orgânica.

A fase DES pôde ser comparada ao estado inicial das amostras (CCAL (1:4) $t=0$ e CCAO $t=0$), levando à conclusão de que as amostras CCAO-DCM foram mais suprimidas de material antioxidante do que as demais. Assim é possível que uma parte significativa desses compostos tenha sido transferida para a fase separada. Da mesma forma, os dados de ABTS e DPPH da fase DES mostram um aumento na concentração necessária para atingir a inibição de cada radical, em comparação com as amostras iniciais, corroborando que as novas amostras foram efetivamente esgotadas de material antioxidante durante o procedimento de separação utilizado.

Por fim, é importante destacar que o procedimento adotado não foi o ideal para ser considerado como método de separação das misturas eutéticas dos extrativos, sendo utilizado apenas como uma abordagem analítica para facilitar as análises posteriores. Ainda são necessárias investigações mais concretas para desenvolver processos de separação mais adequados, utilizando solventes mais ambientalmente amigáveis e não tóxicos à saúde humana, especialmente considerando o potencial farmacológico dos bioativos alvo.

5.3 Atividade Citotóxica

Os ensaios de citotoxicidade começaram com a diluição das amostras de melhor desempenho na extração SBH, à base de CCAL 1:4 e CCAO, a 50°C. Essas amostras brutas, contendo DES e extrativos, foram diluídas em PBS na concentração de 1 mg.mL⁻¹ para um teste preliminar na linha celular de câncer de mama (MDA-MB-231), realizado em intervalos de 24, 48 e 72 horas. No entanto, esses testes não foram conclusivos quanto ao efeito citotóxico dos extratos, uma vez que, após apenas 24 horas, houve morte celular superior a 90% devido à alta acidez dos DESs.

A primeira estratégia utilizada para prosseguir com os testes de citotoxicidade foi neutralizar a acidez dos DESs, utilizando uma solução de NaOH (0,01 M). Contudo, a amostra de CCAO formou um precipitado ao entrar em contato com a solução básica e não pôde ser testada. Apenas as amostras com DES CCAL 1:4 apresentaram uma solução homogênea após

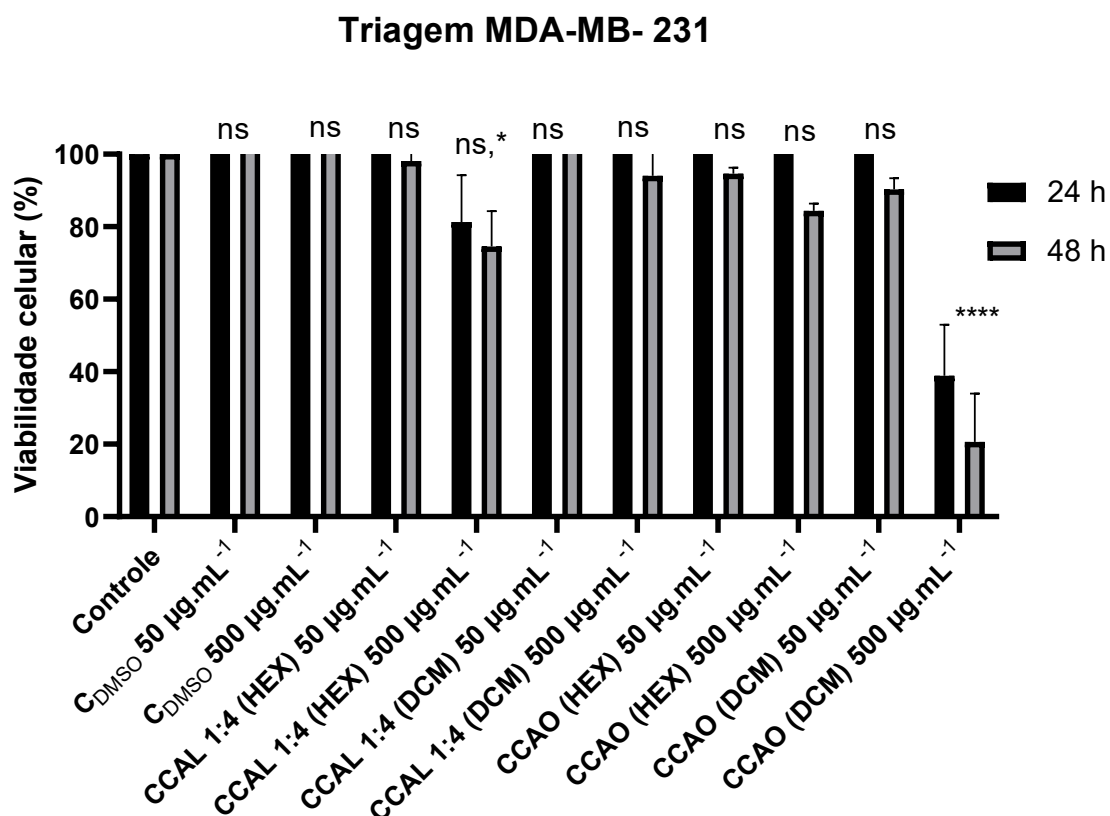
a neutralização e foram diluídas em concentrações de $0,25\text{-}5\text{ mg.mL}^{-1}$ para os testes. Os resultados indicaram que o próprio DES tem efeito citotóxico a partir de $0,5\text{ mg.mL}^{-1}$. Portanto, as amostras a serem utilizadas em ensaios citotóxicos não deveriam conter altas concentrações de DES, sendo preferível utilizar as frações separadas.

Por esse motivo, foi adotada uma segunda estratégia de separação utilizando solventes orgânicos voláteis, como hexano e diclorometano. Esses solventes conseguiram gerar extratos secos e visualmente livres de DES, que foram analisados e confirmaram a presença de material antioxidante. No entanto, apenas as amostras provenientes das extrações por SBH apresentaram material suficiente para continuar as análises, enquanto as extrações por UBT geraram uma quantidade insuficiente de material. Com base nesses resultados, os extratos obtidos por extração SBH com CCAL 1:4 e CCAO, separados com hexano e diclorometano, foram escolhidos para os testes de citotoxicidade.

Estes extratos secos recuperados foram inicialmente testados quanto ao seu potencial anticancerígeno nas concentrações de $50\text{ e }500\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, utilizando amostras diluídas a partir de um estoque de 10 mg.mL^{-1} em PBS com 8,33% (v/v) de DMSO. Para fins de comparação, foi utilizado um controle com PBS e DMSO (C_{DMSO}), diluído nas mesmas condições que as amostras. Os resultados desses ensaios são apresentados na Figura 23. O DMSO não demonstrou efeitos significativos na viabilidade celular, de modo que os valores observados nas amostras podem ser atribuídos às propriedades individuais dos extratos, sem interferência do solvente.

Entre as amostras, apenas CCAL 1:4 (HEX) e CCAO-DCM mostraram um efeito significativo na variação da viabilidade celular. Esse efeito foi mais evidente nos testes de 48 horas, onde o aumento da concentração resultou em uma redução na viabilidade celular. O extrato de CCAO separado com diclorometano foi o mais promissor, alcançando uma diminuição da viabilidade celular para menos de 50% em 48 horas, destacando-se para testes com outras linhas celulares. Esse desempenho nas amostras recuperadas com hexano se deve, particularmente, ao fato de que as anonacinas, compostos aos quais é atribuída essa atividade anticancerígena, se diluem melhor em solventes apróticos polares, como o diclorometano, em vez do hexano. Assim, o diclorometano pode favorecer a solubilização das anonacinas por meio de interações de solvatação, atuando como um solvente aprótico polar capaz de estabilizar compostos parcialmente carregados ou polares por meio de interações intermoleculares. (Lopez-Romero *et al.*, 2022).

Figura 23 – Triagem das amostras da fase orgânica (*) na atividade citotóxica (**) em células de câncer de mama.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

(*) Amostras provenientes do método de extração SBH (50°C) com CCAL 1:4 e CCAO, obtidas da recuperação de compostos via separação Líquido-Líquido com solventes orgânicos voláteis (HEX e DCM).

(**) Os valores são apresentados como média $\pm$ DP ($n \geq 3$). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA one-way de Tukey.

Outros ensaios com duração de 48 horas foram realizados, incluindo amostras extraídas com água e etanol nas condições ótimas dos métodos SBH e UBT, além dos extratos etanólicos e metanólicos obtidos por soxhlet e Mixer. Estes ensaios foram realizados nas linhas celulares 231 utilizando a mesma metodologia da triagem inicial, realizada para os extratos obtidos com DES e separados com solvente orgânico.

Após 48 horas de teste, apenas os poços contendo as amostras mais concentradas (0,5 mg.mL⁻¹) mostraram uma redução na viabilidade celular para cerca de 70-80%. Esses resultados estão de acordo com dados da literatura que comparam extrações de compostos de matrizes

vegetais utilizando DES e solventes convencionais. No último caso, a simples agitação com solventes como água e etanol não consegue extrair grandes concentrações de compostos antioxidantes e anticancerígenos.

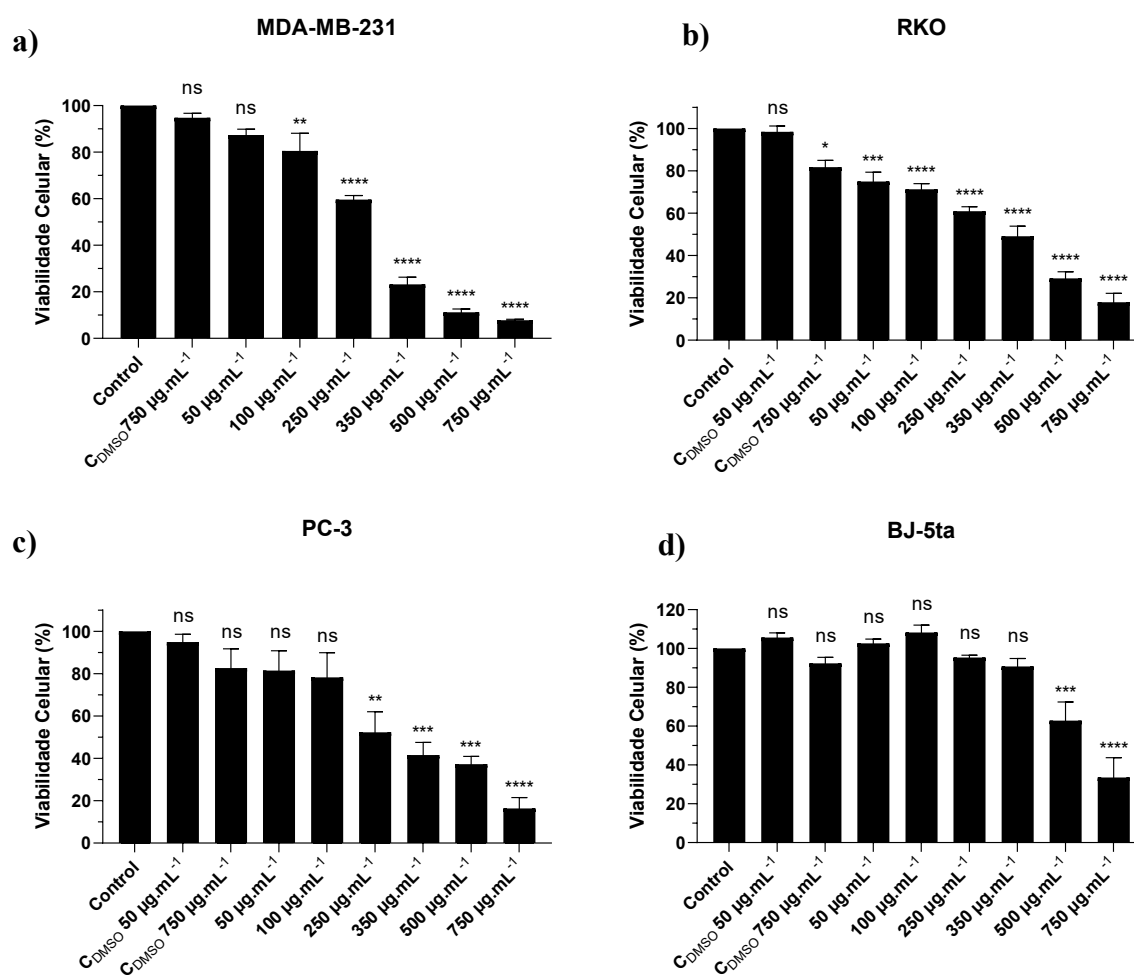
Por outro lado, os DESs, sob as mesmas condições, demonstram ser mais eficazes, extraindo uma maior quantidade de material. Isso reforça o papel dos DESs como agentes eficientes na extração de compostos anticancerígenos de células vegetais, um resultado que não é observado com métodos de extração convencionais (Bubalo *et al.*, 2016; Loukri *et al.*, 2022; Ueda, 2020).

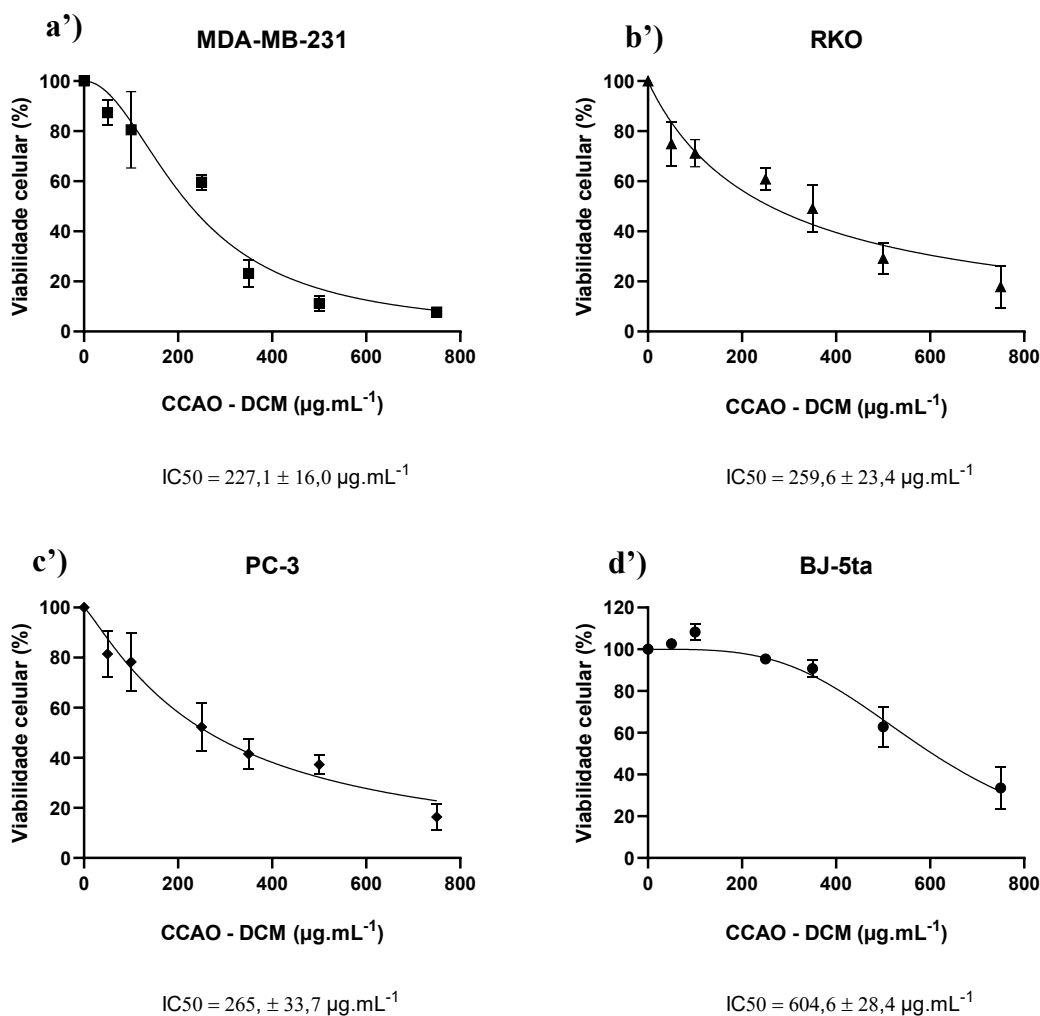
Apesar desses indícios outros trabalhos já haviam detectado atividade anticancerígena em extratos metanólicos e etanólicos da folha da graviroleira (Torres *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015). É possível então, que esses extratos, ao serem diluídos em PBS não permitiram a diluição total dos compostos de interesse (acetogeninas) que são conhecidos por serem hidrofóbicos (Allegrand *et al.*, 2010; Allen; Greiner; Wishart, 2015). No entanto, quando os extratos obtidos com DES foram testados nas mesmas condições, foi observada uma atividade citotóxica contra linhas de células cancerígenas abaixo de 50% após 48 horas. Assim, embora seja necessário mais tempo de exposição para confirmar a atividade anticancerígena dos compostos extraídos por métodos convencionais, os resultados dos extratos CCAO-DCM foram significativamente mais efetivos. A amostra CCAO-DCM foi então testada em diferentes linhas celulares cancerígenas e em uma linha celular normal, com os resultados apresentados na Figura 24.

A presença de DMSO nas amostras não teve influência significativa, exceto na amostra mais concentrada no teste com a linha RKO. No entanto, a viabilidade celular nessa concentração foi muito inferior à do controle, tornando o teste ainda válido.

De modo geral, os resultados mostram uma diminuição na viabilidade das células cancerígenas à medida que a concentração da amostra aumenta, com um IC₅₀ de até 261,1 µg.mL⁻¹ para a linha celular PC3, que se mostrou ligeiramente mais resistente do que as outras duas linhas testadas. Em contraste, o teste com a linha de células saudáveis (BJ-5ta) apresentou um IC₅₀ quase três vezes superior ao das células cancerígenas, indicando uma provável resistência das células saudáveis ao efeito citotóxico do extrato da folha de graviroleira, como discutido na literatura (Moraes *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2022). Isso também confirma a seletividade das moléculas extraídas da folha de graviola, sugerindo que uma concentração ideal em torno de 400 µg.mL⁻¹ pode ser eficaz contra células cancerígenas sem afetar as células saudáveis.

Figura 24 – Atividade citotóxica das amostras CCAO-DCM contra as linhagens celulares (a1) MDA-MB-231 (câncer de mama), (b1) RKO, (c1) PC-3 e (d1) BJ5-ta. Os gráficos a'–d' representam os perfis de viabilidade celular utilizados para determinar os valores de IC₅₀ de cada linhagem celular.





Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

(*) Os valores são apresentados como média $\pm$ DP ($n \geq 3$). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA one-way de Tukey. Caracteres idênticos indicam que não há diferenças significativas entre os valores. "ns" indica que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores, considerando um nível de confiança de no mínimo 95%.

É importante ressaltar que, no caso dos DES utilizados neste estudo, esses sistemas já demonstram atividade antimicrobiana, conforme relatado por Bedair *et al.* (2024). Dessa forma, a presença residual de DES nos extratos poderia, em princípio, influenciar os resultados observados. No entanto, os ensaios em branco, realizados com os DES isoladamente (na ausência dos extratos e nas mesmas condições de recuperação com diclorometano e hexano) não apresentaram quantidade suficiente de material recuperado para análise (inferior a 1 mg).

A diferença gravimétrica registrada foi extremamente baixa, situando-se na faixa de erro da balança, o que indica que apenas traços mínimos de DES foram transferidos para os solventes.

Além disso, o teste de citotoxicidade realizado com essa amostra na concentração possível ($50 \mu\text{g. mL}^{-1}$) não demonstrou efeito sobre a viabilidade celular. Contudo, devido à quantidade final de material ser muito pequena, as diluições necessárias para repetir o teste em concentrações maiores não seriam comparáveis aos ensaios anteriores, em virtude da menor disponibilidade de nutrientes para as células. Essas informações reforçam a hipótese de que a atividade detectada neste estudo está majoritariamente associada aos compostos extraídos da folha.

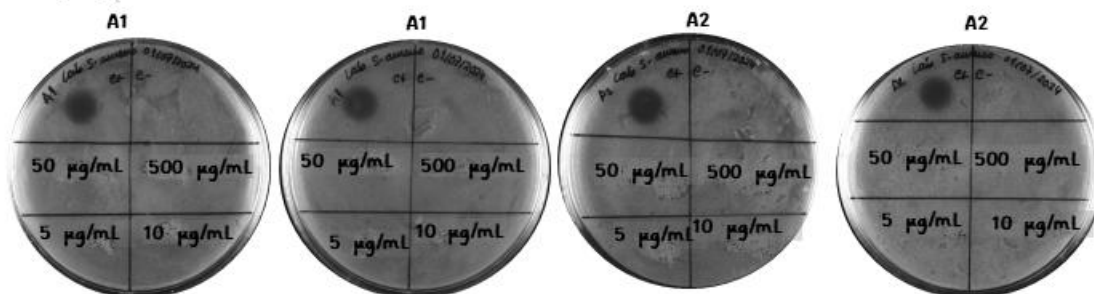
5.4 Atividade Antimicrobiana

Inicialmente, foram realizados ensaios antimicrobianos utilizando o modelo de disseminação em camada dupla de ágar, conforme descrito por (Kropinski *et al.*, 2009) com algumas modificações. Nesse protocolo, uma primeira camada de ágar é depositada em placas estéreis; após o espalhamento dos microrganismos, adiciona-se uma segunda camada de ágar mais diluído. As amostras são então aplicadas na superfície, e a formação de halos de inibição é esperada a partir da difusão dos compostos pela matriz de ágar, inicialmente na direção perpendicular e posteriormente ao longo da camada onde os microrganismos se encontram.

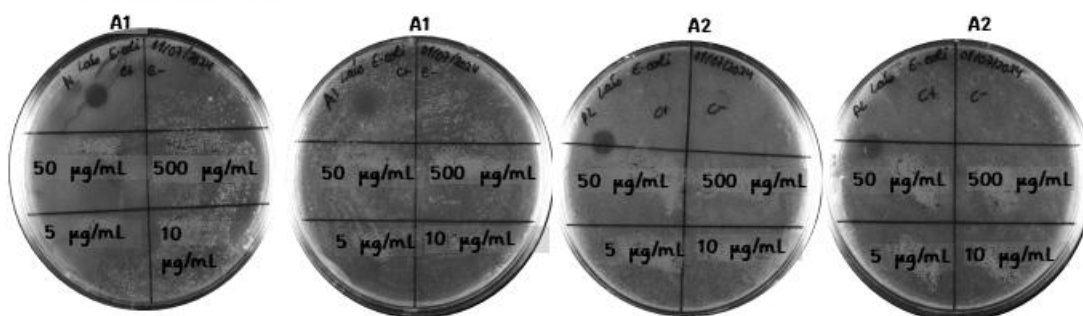
Embora esse método seja amplamente validado e já tenha sido utilizado com sucesso em estudos anteriores conduzidos no mesmo laboratório, no presente trabalho ele não se mostrou eficaz para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos testados. Observou-se uma limitação relacionada à difusão dos compostos nas camadas de ágar, o que resultou em ausência de halos de inibição mesmo nas amostras mais concentradas (50 mg.mL^{-1}), como evidenciado na Figura 25.

Figura 25- Ensaio de atividade antimicrobiana via espalhamento em placa (*) para as amostras: (A1) CCAO DCM e (A2) CCAO-HEX em diferentes concentrações.

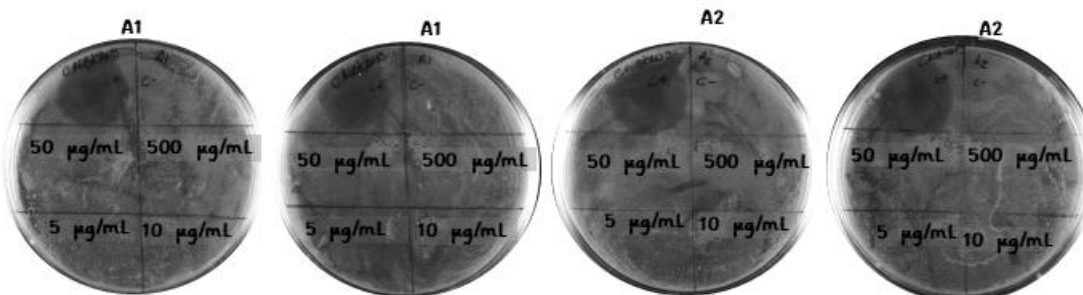
Staphylococcus aureus



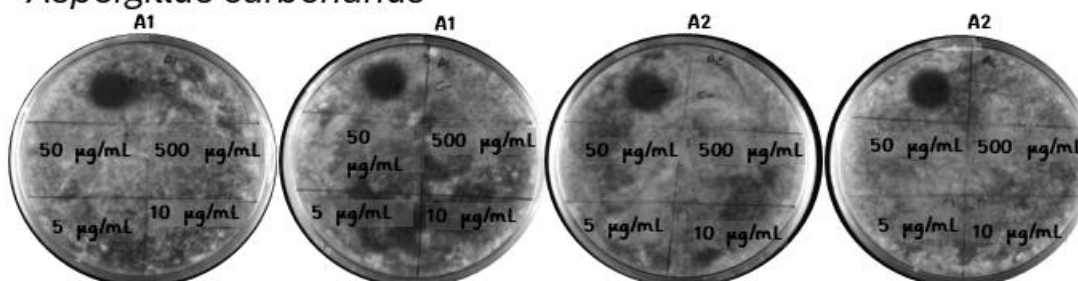
Escherichia coli



Candida albicans



Aspergillus carbonarius



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

(*)Nos ensaios, foi seguido o protocolo descrito nas normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). As placas foram organizadas em linha para cada microrganismo, posicionando-se lado a lado com as respectivas réplicas das amostras A1 e A2. Cada placa foi

dividida em zonas, sendo a parte superior destinada aos controles: controle positivo (C^+) e controle negativo (C^-). Na parte inferior, foram distribuídas quatro zonas correspondentes às diferentes concentrações das amostras testadas: 5, 10, 50 e 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os controles positivos utilizados e suas concentrações para cada microrganismo foram: Ampicilina para *Escherichia coli* (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e *Staphylococcus aureus* (0,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); Miconazol (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) para *Candida albicans* e Anfotericina B (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) para *Aspergillus carbonarius*. O controle negativo foi realizado com os solventes utilizados para a diluição dos compostos testados.

Vale destacar que os controles positivos apresentaram halos nítidos de inibição, o que valida a execução técnica do ensaio. No entanto, nenhuma atividade antimicrobiana foi detectada para os extratos testados frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Aspergillus carbonarius*. Diante desses resultados, foi necessário empregar estratégias metodológicas complementares para confirmar se a ausência de atividade antimicrobiana se devia de fato à composição dos extratos ou à inadequação do modelo experimental para esse tipo de amostra.

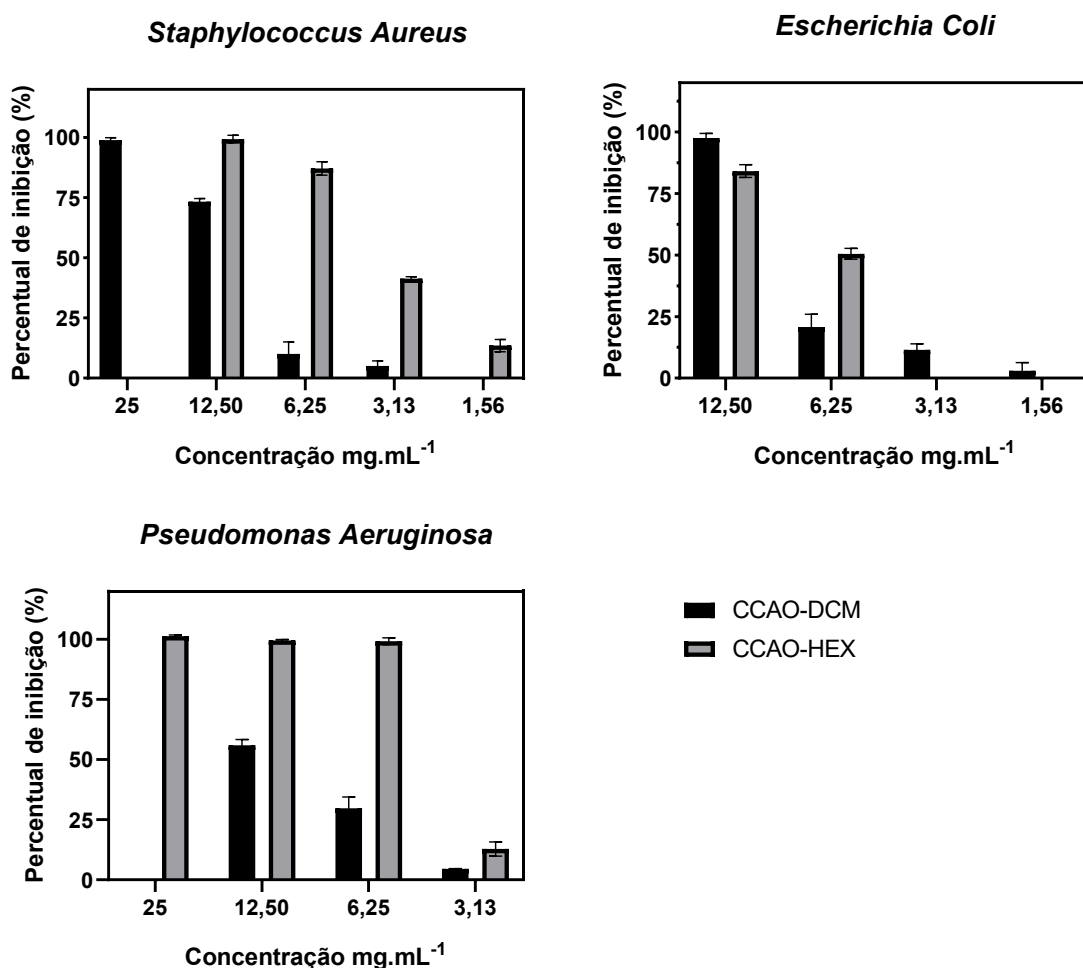
O novo modelo utilizado foi o modelo de microdiluição em placas de 96 poços descrito na metodologia. Os novos ensaios de atividade antimicrobiana demonstraram que a fração CCAO-HEX foi capaz de inibir o crescimento dos microrganismos testados (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), evidenciando um espectro de ação mais eficaz e amplo. Em resumo, a fração CCAO-DCM apresentou inibição do crescimento microbiano na faixa de concentração de 6,25-25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, enquanto a fração CCAO-HEX foi eficaz já a partir de 3,13-12,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, como apresentado na Figura 26 e na Tabela 8.

Apesar da fração CCAO-HEX não ter demonstrado atividade anticancerígena nos testes realizados, os resultados sugerem a presença de compostos com atividade antimicrobiana relevante. Este achado reforça a importância dessa fração no contexto do estudo, destacando seu potencial em formulações destinadas ao combate de infecções microbianas. Além disso, é importante ressaltar que a fração CCAO-HEX, considerada não citotóxica frente a células humanas, exigiu concentrações mais elevadas para exercer efeito antimicrobiano, o que pode indicar maior segurança biológica associada, porém ainda eficaz.

A nova técnica empregada foi capaz de fornecer conclusões mais precisas sobre a atividade antimicrobiana das amostras, sem apresentar as limitações observadas na técnica anterior, especialmente no que diz respeito à difusão em meio sólido. Grande parte dos compostos extraídos das folhas da graviroleira corresponde a óleos essenciais, que possuem natureza hidrofóbica, dificultando sua solubilização e difusão em meios aquosos. Assim, as

características físico-químicas das amostras podem ter sido um fator determinante para o insucesso da técnica de difusão em ágar. Por outro lado, na metodologia de microdiluição em placas, essa etapa de difusão não é crítica, já que as amostras são diretamente diluídas nos poços contendo o meio e os microrganismos, eliminando a necessidade de difusão por camadas sólidas.

Figura 26- Percentual de inibição microbiana obtido a partir do teste de microdiluição em caldo (*) com as amostras CCAO-DCM e CCAO-HEX frente a diferentes microrganismos patogênicos.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

(*) Os ensaios foram realizados de acordo com a normatização internacional estabelecida pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), conforme o manual M07-A10 (2015). Para cada ensaio, foram preparadas duplicatas a triplicatas das amostras, considerando como

controle negativo os poços nos quais não foi adicionada amostra e o crescimento bacteriano ocorreu livremente. Foi utilizado, como branco das amostras, poços contendo apenas o caldo acrescido da amostra, mas sem microrganismos, para detecção de possíveis interferentes, como cor ou contaminação da própria amostra.

Tabela 8- Faixa de concentração inibitória mínima (MIC) determinada para as amostras CCAO-DCM e CCAO-HEX frente às cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* por meio do ensaio de microdiluição em caldo.

Amostras	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
CCAO-DCM	12,5-25,0 mg.mL ⁻¹	6,25-12,5 mg.mL ⁻¹	Não eficaz na faixa testada (até 12,5 mg.mL ⁻¹)
CCAO-HEX	3,13-6,25 mg.mL ⁻¹	6,25-12,5 mg.mL ⁻¹	3,13-6,25 mg.mL ⁻¹

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Quando comparadas com outros trabalhos da literatura, as faixas de MIC observadas neste estudo estão de acordo com algumas já reportadas. Como o caso em que Vieira *et al.* (2019), observaram valores de MIC em torno de 15 mg/mL para extratos de *Juglans regia* diluídos em água, utilizando a mesma metodologia.

Em outros casos, as faixas de MIC observadas neste estudo são inferiores como em comparação a Pinto *et al.* (2017) que relataram MICs entre 78 e 1250 µg/mL (0,078 a 1,25 mg/mL) para extratos metanólicos de folhas de *Annona muricata*, com atividade significativa frente a microrganismos como *Staphylococcus aureus* (156 µg/mL), *Escherichia coli* (625 µg/mL) e *Pseudomonas aeruginosa* (625 µg/mL). Já neste estudo, as frações CCAO-DCM e CCAO-HEX apresentaram MICs entre 3,13-12,5 mg/mL, o que corresponde a 5-20 vezes valores superiores. Ainda assim, a fração CCAO-HEX demonstrou inibição frente aos três microrganismos testados, sugerindo que compostos presentes nessa fase, mesmo que em menores concentrações ou com menor potência, contribuem para a atividade antimicrobiana observada.

Além disso, ao comparar os resultados obtidos neste estudo com os de outras abordagens alternativas que facilitam a entrega dos compostos, como o uso de nanopartículas impregnadas com os extratos, observa-se uma diferença significativa nas faixas de concentração eficaz. Nessas condições, Badmus *et al.* (2020) relataram inibições de crescimento bacteriano em

concentrações entre 50 e 100 µg/mL (0,05 a 0,1 mg/mL), com níveis de inibição superiores a 60% para *Staphylococcus aureus* e cerca de 54% para *Pseudomonas aeruginosa*, ou seja, ou seja, valores de 30 a 125 vezes inferiores aos observados neste estudo. Essa diferença pode ser atribuída não apenas à potência intrínseca dos agentes antimicrobianos, mas também aos mecanismos de ação envolvidos. Segundo os autores, as nanopartículas atuam diretamente na desorganização das estruturas bacterianas, afetando a membrana celular, a respiração, a replicação do DNA e promovendo estresse oxidativo.

Por outro lado, os extratos vegetais, mesmo com princípios ativos comprovadamente efetivos, atuam sem o auxílio de sistemas de entrega e ainda estão sujeitos às características do meio, como a influência da oxidação e da variação do pH, fatores que um suporte poderia estabilizar. Por isso, os estudos atuais estão focados em estratégias de estabilização dos bioativos, ao mesmo tempo em que se busca criar uma ferramenta de entrega do fármaco. Contudo, este trabalho aponta novas estratégias para a obtenção primordial do material antes dessa etapa, sendo ainda uma informação relevante do ponto de vista de uma produção em larga escala. Assim, pode-se concluir que a extração com DES é mais eficiente do que o método convencional de extração, mas ainda são necessários estudos das etapas posteriores que proporcionem uma recuperação aprimorada do material extraído.

6 CONCLUSÃO

Foram realizadas extrações de compostos bioativos das folhas de gravioleira utilizando DES. Os resultados indicaram um ponto ótimo de extração a 50 °C por 120 minutos no método SBH e a temperatura ambiente por 30 minutos no método UBT, com uma proporção massa/volume de 1:10 m/v. O DES a base de Cloreto de colina e ácido oxálico -CCAO e o DES a base de Cloreto de colina e ácido láctico-CCAL 1:4 destacaram-se como os solventes mais eficazes, contribuindo para as melhores performances devido às suas propriedades ácidas, mesmo considerando suas características de elevada viscosidade, densidade e tensão superficial em comparação com os outros solventes testados. Além disso, as extrações realizadas com DES superaram aquelas com etanol e água nas mesmas condições operacionais, com base nos valores de atividade antioxidante. A alta acidez foi um fator decisivo para melhorar as extrações; no entanto, estudos mais aprofundados são necessários para determinar a estabilidade dos bioativos em meio aos DESs.

Os DESs possibilitaram a preservação dos extrativos, evitando sua degradação mesmo após o armazenamento das amostras, devido à sua estabilidade química e elevada acidez. Esse fator, aliado ao efeito estabilizador das moléculas promovido pelo ácido oxálico, resultou em um aumento da capacidade antioxidante dos extratos após seis meses de armazenamento. Nesse contexto, os extratos obtidos por meio do método com banho ultrassônico alcançaram valores de capacidade antioxidante comparáveis aos obtidos com o método SBH em apenas 30 minutos de operação, configurando-se como uma alternativa mais simples e preferível.

Posteriormente, foi aplicada uma técnica de separação líquido-líquido a fim de recuperar os compostos utilizando solventes orgânicos voláteis, capazes de gerar sistemas bifásicos com os DESs. Entre os solventes com maior eficiência de separação de extrativos, destacaram-se o diclorometano e o hexano, que contribuíram com recuperação de uma quantidade significativa de compostos do meio contendo DES. No entanto, ainda se faz necessário realizar estudos de recuperação definitivos com solventes mais limpos e ambientalmente amigáveis, bem como investigar sistemas de separação mais eficientes para validar esses extratos quanto ao seu potencial uso farmacológico.

As amostras recuperadas foram avaliadas quanto à atividade citotóxica e o principal resultado foi obtido para a amostra extraída com CCAO pelo método SBH, a 50 °C e recuperada com diclorometano. Os testes confirmaram a atividade citotóxica dessa amostra contra linhas celulares de câncer de mama (MDA-MB-231), câncer de cólon (RKO) e câncer de próstata

(PC3). A mesma amostra apresentou menor efeito citotóxico e maior seletividade em comparação com os testes realizados com linhas celulares saudáveis de fibroblastos (BJ-5ta).

A fase recuperada com hexano não apresentou bom desempenho contra as células cancerígenas, no entanto, mostrou boa atividade contra os microrganismos avaliados (*E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*), com um MIC a partir de 6,25 mg.mL⁻¹, sugerindo potencial aplicação como agente antimicrobiano. Além disso, essa amostra não apresentou efeito citotóxico, o que indica que pode ser utilizada em concentrações mais elevadas como fármaco.

Esses resultados indicam que o método SBH, aliado ao uso de solventes adequados para recuperação, é eficiente na extração de compostos bioativos da folha da graviroleira. Além disso confirma que sistemas simples como a agitação, pode ser de grande importância para a obtenção de compostos bioativos valiosos, que não são obtidos com a mesma intensidade e simplicidade por procedimentos convencionais. Portanto, é fundamental continuar os estudos para aprimorar o uso dos DESs em processos de tratamento de biomassa e valorização de resíduos.

7 PROPOSTA DE CONTINUIDADE

- **Desenvolvimento de Métodos de Recuperação**

Desenvolver e otimizar um método para a recuperação dos compostos da fase DES utilizando solventes mais limpos e ambientalmente amigáveis e/ou por meio de métodos de separação envolvendo operações unitárias em fases como colunas de separação, para otimizar a eficiência da recuperação dos compostos.

- **Estudo do Sistema de Reciclagem de DES**

Investigar a viabilidade de implementar um sistema de reciclagem para os DESs utilizados no processo de extração, como a possibilidade de sistema de extração de múltiplos ciclos de uso.

- **Estudo de um método de entrega dos bioativos no organismo.**

Incorporar conhecimentos atualizados, com ênfase na aplicação de sistemas de estabilização e liberação controlada de compostos bioativos após sua extração e isolamento, utilizando suportes com elevado potencial de adsorção ou encapsulamento, visando maximizar a concentração e a biodisponibilidade dos princípios ativos.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, A. P. *et al.* Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids. **Journal of the American Chemical Society**, [S.L.], v. 126, n. 29, p. 9142–9147. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja048266j>.
- ABE, M. *et al.* Dynamic function of the spacer region of acetogenins in the inhibition of bovine mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). **Biochemistry**, [S.L.], v. 47, n. 23, p. 6260–6266, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi800506s>.
- ADEWOLE, S. O.; OJEWOLE, J. A. O. Protective effects of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin-treated diabetic rats. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 30–37, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v6i1.57071>.
- ADEYEMI, D. O. *et al.* Anti hyperglycemic activities of *Annona muricata* (Linn). **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 62–69, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v6i1.57075>.
- AGUILAR-HERNÁNDEZ, G. *et al.* Antibacterial Activity of Crude Extract and Purified Acetogenins from *Annona muricata* Seeds. **Applied Sciences**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 558, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app13010558>.
- AKINSIKU, A. A.; ODAUDU, R. O.; EJILUDE, O. Antimicrobial and cytotoxicity evaluation of *Annona muricata*-based silver-cobalt nanoparticles on WEHI 164 cell line. **Results in Chemistry**, [S.L.], v. 15, p. 102230, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2025.102230>.
- AL KAZMAN, B. S. M.; HARNETT, J. E.; HANRAHAN, J. R. Identification of Annonaceous Acetogenins and Alkaloids from the Leaves, Pulp, and Seeds of *Annona atemoya*. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 24, n. 3, p. 2294, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms24032294>.
- ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: Recent progress. **Journal of Natural Products**, [S.L.], v. 62, n. 3, p. 504–540, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/np980406d>.
- ALI, A. H. Experimental investigations on effects of ZnO NPS and *annona muricata* extract for in vitro and in vivo antibacterial activity. **Materials Today: Proceedings**, [S.L.], v. 57, p. 527–530, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.01.415>.
- ALLEGRAND, J. *et al.* Structural study of acetogenins by tandem mass spectrometry under high and low collision energy. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [S.L.], v. 24, n. 24, p. 3602–3608, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/rcm.4805>.
- ALLEN, F.; GREINER, R.; WISHART, D. Competitive fragmentation modeling of ESI-MS/MS spectra for putative metabolite identification. **Metabolomics**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 98–110, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0676-4>.

ALVES, R. S. *et al.* Synthesis and application of castor oil maleate and castor oil maleate-styrene copolymers as demulsifier for water-in-oil emulsions. **Fuel**, [S.L.], v. 269, p. 117429, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117429>.

ALVES, S. *et al.* Enhancement of Acetate-Induced Apoptosis of Colorectal Cancer Cells by Cathepsin D Inhibition Depends on Oligomycin A-Sensitive Respiration. **Biomolecules**, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 473, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom14040473>.

AROSO, I. M. *et al.* Dissolution enhancement of active pharmaceutical ingredients by therapeutic deep eutectic systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S.L.], v. 98, p. 57–66, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.11.002>.

AZMIR, J. *et al.* Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **Journal of Food Engineering**, [S.L.], v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>.

BADMUS, J. A. *et al.* Photo-assisted bio-fabrication of silver nanoparticles using *Annona muricata* leaf extract: exploring the antioxidant, anti-diabetic, antimicrobial, and cytotoxic activities. **Heliyon**, [S.L.], v. 6, n. 11, p. e05413, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05413>.

BALDERRAMA-CARMONA, A. P. *et al.* Antiviral, Antioxidant, and Antihemolytic Effect of *Annona muricata* L. Leaves Extracts. **Plants**, [S.L.], v. 9, n. 12, p. 1650, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants9121650>.

BALLESTEROS, L. F. *et al.* Characterization of polysaccharides extracted from spent coffee grounds by alkali pretreatment. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 127, p. 347–354, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.047>.

BEDAIR, H. M.; SAMIR, T. M.; MANSOUR, F. R. Antibacterial and antifungal activities of natural deep eutectic solvents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], v. 108, n. 1, p. 198, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13044-2>.

BENVENUTTI, L.; ZIELINSKI, A. A. F.; FERREIRA, S. R. S. Which is the best food emerging solvent: IL, DES or NADES? **Trends in Food Science and Technology**, [S.L.], v. 90, p. 133–146, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.003>.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.

BERMEJO, A. *et al.* Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural product reports**, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 269–303, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/B500186M>.

BESSA, A. M. M. *et al.* Low viscosity lactam-based ionic liquids with carboxylate anions: Synthesis, characterization, thermophysical properties and mutual miscibility of ionic liquid with alcohol, water, and hydrocarbons. **Journal of Molecular Liquids**, [S.L.], v. 313, p. 113586, set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113586>.

BEZERRA, C. F. *et al.* Analysis by UPLC-MS-QTOF and antifungal activity of guava (*Psidium guajava* L.). **Food and Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 119, 2018, p. 122–132. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.021>.

BHARDWAJ, R. *et al.* **Bioactive compounds of *Annona***. In: MURTHY, H.; BAPAT, V. (Eds.). *Bioactive compounds in underutilized fruits and nuts*. Cham: Springer, 2019. p. 1-26. (Reference Series in Phytochemistry). Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-06120-3_5-1. Acesso em 12 ago. 2024.

BUARQUE, F. S. *et al.* Development of hydrophobic eutectic solvents composed of DL-menthol and fatty acids/alcohols: Application in the extraction of capsaicinoids and carotenoids from *Capsicum frutescens*. **Journal of Molecular Liquids**, [S.L.], v. 417, p. 126591, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.126591>.

BUBALO, M. *et al.* Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. **Food Chemistry**, v. 200, p. 159–166, 2016. [S.L.], Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.040>.

CARVALHO, M. T. D.; BERGAMASCO, R.; GOMES, R. G. Methods of extraction of bioactive compounds: utilization of byproducts in agroindustry: Utilization of byproducts in agroindustry. **Uningá Review**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 66–84, 2018. Disponível em: <https://revista.uninga.br/uningareviews/article/view/1534>.

CARVALHO, N. C. C. *et al.* Phytochemical Analysis of the Fruit Pulp Extracts from *Annona crassiflora* Mart. and Evaluation of Their Antioxidant and Antiproliferative Activities. **Foods**, [S.L.], v. 11, n. 14, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods11142079>.

CHAMPY, P. *et al.* Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. **Journal of Neurochemistry**, [S.L.], v. 88, n. 1, p. 63–69, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02138.x>.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard**. 10th ed. Wayne, 2015. Disponível em: <https://clsi.org>. Acesso em: 01 jul. 2025.

CORREIA, N. H. **Síntese Multicomponente de 2,4,5-triarilimidazóis e de 1,2,4,5-Tetrarilimidazóis em Meio de Solventes Eutéticos**. 59 f. Trabalho de conclusão de graduação – Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, 2021. Disponível em <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/222776>.

COSTA, A. C. F. **Estudo das Propriedades Termofísicas dos Solventes Eutéticos e Desenvolvimento de Novas Membranas Sustentáveis para a Separação de CO₂**. 114 f. Dissertação – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2016. Disponível em: <https://run.unl.pt/handle/10362/19954>.

COSTA, A. R. *et al.* Phytochemical profile of *Anacardium occidentale* L. (cashew tree) and the cytotoxic and toxicological evaluation of its bark and leaf extracts. **South African Journal of Botany**, [S.L.], v. 135, p. 355–364, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.09.017>.

CUI, Y. *et al.* The solubility and interactions of gelatin in “water-in-sodium acetate trihydrate/urea-DES” system. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S.L.], v. 625, p. 126916, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.126916>.

CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O. Extraction techniques with deep eutectic solvents. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 105, p. 225–239, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.05.001>.

DADDIOUAISSA, D. *et al.* Antiproliferative activity of ionic liquid-graviola fruit extract against human breast cancer (MCF-7) cell lines using flow cytometry techniques. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 236, p. 466–473, 2019. Disponível em: [10.1016/j.jep.2019.03.003](https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.03.003).

DAI, Y. *et al.* Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus tinctorius* L. **Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 85, n. 13, p. 6272–6278, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac400432>.

DAI, Y. *et al.* Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. **Analytica Chimica Acta**, [S.L.], v. 766, p. 61–68, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>.

DAI, Y. *et al.* Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 187, p. 14–19, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.123>.

DAMRONGRAK, K. *et al.* Delivery of acetogenin-enriched *Annona muricata* Linn leaf extract by folic acid-conjugated and triphenylphosphonium-conjugated poly(glycerol adipate) nanoparticles to enhance toxicity against ovarian cancer cells. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 618, p. 121636, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121636>.

DELISO, I. *et al.* NMR study of choline chloride-based deep eutectic solvents. **Journal of Molecular Liquids**, [S.L.], v. 290, p. 111236, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111236>.

DIAS, M. C. G. C. Caracterização do solvente eutético profundo aplicado em extração líquido-líquido. 2016. 136f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

DWAMENA, A. K. Recent advances in hydrophobic deep eutectic solvents for extraction. **Separations**, [S.L.], v. 6, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/separations6010009>.

EL SAYED, A. M. *et al.* LC–MS/MS and GC–MS profiling as well as the antimicrobial effect of leaves of selected *Yucca* species introduced to Egypt. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 10, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74440-y>.

ESPARTERO, J. L. *et al.* NMR analysis of low molecular weight poly(lactic acid)s. **Macromolecules**, [S.L.], v. 29, n. 10, p. 3535–3539, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ma950529u>.

FERREIRA, D. *et al.* Exosomes modified with anti-MEK1 siRNA lead to an effective silencing of triple negative breast cancer cells. **Biomaterials Advances**, [S.L.], v. 154, p. 213643, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213643>.

FLORINDO, C.; BRANCO, C.; MARRUCHO, M. Quest for green-solvent design: from hydrophilic to hydrophobic (deep) eutectic solvents. **ChemSusChem**, [S.L.], v. 12, n. 8, p. 1549–1559, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cssc.201900147>.

FOFANA, S. *et al.* Alkaloids from *Annona muricata* leaves. **Chemistry of Natural Compounds**, [S.L.], v. 47, p. 321, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10600-012-0363-5>.

GAVAMUKULYA, Y. *et al.* *Annona muricata* silver nanoparticles exhibit strong anticancer activities against cervical and prostate adenocarcinomas through regulation of CASP9 and the CXCL1/CXCR2 genes axis. **Tumor Biology**, [S.L.], v. 43, n. 1, p. 37–55, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/TUB-200058>.

GAVAMUKULYA, Y. *et al.* Phytochemical screening, antioxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, [S.L.], v. 14, p. 1–16, 2014. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60258-3](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60258-3).

GEORGE, V. C. *et al.* Antioxidant, DNA protective efficacy and HPLC analysis of *Annona muricata* (soursop) extracts. **Journal of Food Science and Technology**, [S.L.], v. 52, n. 4, p. 2328–2335, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1289-7>.

GHORBANI-VAGHEI, R. *et al.* A practical and efficient synthesis of bis(indolyl)methanes in water, and synthesis of di-, tri-, and tetra(bis-indolyl)methanes under thermal conditions catalyzed by oxalic acid dihydrate. **Molecular Diversity**, [S.L.], v. 14, p. 87–96, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11030-009-9150-z>.

GONZÁLEZ-LÓPEZ, A. M. *et al.* Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth and physiology of *Annona muricata* (L.) under two irrigation levels under greenhouse conditions. **Scientia Horticulturae**, [S.L.], v. 344, p. 114115, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2025.114115>.

GUILLÉN-MELÉNDEZ, G. A. *et al.* Nanoencapsulation of extracts and isolated compounds of plant origin and their cytotoxic effects on breast and cervical cancer treatments: advantages and new challenges. **Toxicon**, [S.L.], v. 244, p. 107753, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2024.107753>.

HADISAPUTRI, Y. E. *et al.* Antiproliferation activity and apoptotic mechanism of soursop (*Annona muricata* L.) leaves extract and fractions on MCF7 breast cancer cells. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, [S.L.], v. 13, p. 447–457, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/BCTT.S317682>.

HASRAT, J. A. *et al.* Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HTergic 5-HT1A receptor agonists in rats: unexploited antidepressive (lead) products. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [S.L.], v. 49, p. 1145–1149, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1997.tb06058.x>.

HORTO Didático de Plantas Medicinais do HU/CCS. Disponível em: <<https://hortodidatico.ufsc.br/tag/diuretico/page/3/>>. Acesso em: 14 ago. 2024.

HUANG, J. *et al.* Ionic deep eutectic solvents for the extraction and separation of natural products. **Journal of Chromatography A**, [S.L.], v. 1598, p. 1–19, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.03.046>.

JACOBSEN, S. S. *et al.* Selective extraction process and characterization of antioxidant phenolic compounds from *Pereskia aculeata* leaves using UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS. **ACS Omega**, [S.L.], v. 9, n. 35, p. 37374–37385, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c05652>.

KACHANGOON, R. *et al.* Cloud-point extraction coupled to in-situ metathesis reaction of deep eutectic solvents for preconcentration and liquid chromatographic analysis of neonicotinoid insecticide residues in water, soil and urine samples. **Microchemical Journal**, [S.L.], v. 152, p. 104377, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104377>.

KIM, G.-T. *et al.* Immunomodulatory efficacy of standardized *Annona muricata* (Graviola) leaf extract via activation of mitogen-activated protein kinase pathways in RAW 264.7 macrophages. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [S.L.], v. 2016, n. 1, p. 2905127, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/2905127>.

KROPINSKI, A. M. *et al.* Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, [S.L.], v. 501, p. 69–76, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_7.

KUMAR, V.; IRFAN, M.; DATTA, A. Manipulation of oxalate metabolism in plants for improving food quality and productivity. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 158, p. 103–109, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.10.029>.

LANNUZEL, A. *et al.* Atypical parkinsonism in Guadeloupe: a common risk factor for two closely related phenotypes? **Brain**, [S.L.], v. 130, n. 3, p. 816–827, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/brain/awl347>.

LEAL, F. C. *et al.* Green solvents to value *Annona muricata* L. leaves as antioxidants source: process optimization and potential as a natural food additive. **Waste and Biomass Valorization**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 1233–1241, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01581-0>.

LEAL, F. C. **Extração de biocompostos da folha de graviroleira (*Annona muricata* L.) com tecnologia assistida por ultrassom empregando solventes verdes**. 2020. 71 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2020.

LEBOEUF, M. *et al.* The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 21, n. 12, p. 2783–2813, 1980. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)85046-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)85046-1).

LEÓN-FERNÁNDEZ, A. E. *et al.* Vista de efecto antibacterial, antifúngico, citotóxico y antioxidante de extractos de pulpa de guanábana. **Revista Bio Ciencias**, [S.L.], v. 6, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e400>.

LI, J. *et al.* Efficient and green strategy based on pulsed electric field coupled with deep eutectic solvents for recovering flavonoids and preparing flavonoid aglycones from noni-processing wastes. **Journal of Cleaner Production**, [S.L.], v. 368, p. 133019, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133019>.

LI AW, C. C. *et al.* New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, [S.L.], v. 65, n. 4, p. 470–475, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/np0105578>.

LIMA, N. N. das C. *et al.* Acetogenins from Annonaceae plants: potent antitumor and neurotoxic compounds. **PharmaNutrition**, [S.L.], v. 20, p. 100295, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2022.100295>.

LOMBA, L. *et al.* Applications of deep eutectic solvents related to health, synthesis, and extraction of natural based chemicals. **Applied Sciences**, [S.L.], v. 11, n. 21, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app112110156>.

LÓPEZ-ROMERO, B. A. *et al.* Extraction of acetogenins using thermosonication-assisted extraction from *Annona muricata* seeds and their antifungal activity. **Molecules**, [S.L.], v. 27, n. 18, p. 6045, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27186045>.

LOUKRI, A. *et al.* Green extraction of caffeine from coffee pulp using a deep eutectic solvent (DES). **Applied Food Research**, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 100176, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100176>.

LUIZA KOOP, B. *et al.* Flavonoids, anthocyanins, betalains, curcumin, and carotenoids: sources, classification and enhanced stabilization by encapsulation and adsorption. **Food Research International**, [S.L.], v. 153, p. 110929, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110929>.

LUZIA BORGES REIS, C. *et al.* Pretreatment of cashew apple bagasse using protic ionic liquids: enhanced enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 224, p. 694–701, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.019>.

MAHMOOD, R. I. *et al.* Biosynthesis of copper oxide nanoparticles mediated *Annona muricata* as cytotoxic and apoptosis inducer factor in breast cancer cell lines. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 16165, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20360-y>.

MARCHEL, M.; CIEŚLIŃSKI, H.; BOCZKAJ, G. Thermal instability of choline chloride-based deep eutectic solvents and its influence on their toxicity—important limitations of DESs as sustainable materials. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, [S.L.], v. 61, n. 30, p. 11288–11300, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.2c01898>.

MARTINS, M. A. P. *et al.* Deep eutectic solvent mediated synthesis of thiomethyltriazolo[1,5-a]pyrimidines. **Journal of Molecular Liquids**, [S.L.], v. 223, p. 934–938, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.08.031>.

MOKHTAR, F. A. *et al.* Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Annona glabra* and *Annona squamosa* extracts with antimicrobial, anticancer, apoptosis potentials, assisted by in silico modeling, and metabolic profiling. **Pharmaceuticals**, [S.L.], v. 15, n. 11, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph15111354>.

MONARRES-CUEVAS, O. *et al.* Physical, chemical, and physiological characterization of chilling injury in soursop fruit (*Annona muricata* L.). **Postharvest Biology and Technology**, [S.L.], v. 193, p. 112052, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.112052>.

MONTALVO-GONZÁLEZ, E. *et al.* Polyethylene glycol/soy lecithin-nanosuspensions as carriers of acetogenins: optimization, characterization, antibacterial and hemolytic activity. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [S.L.], v. 91, p. 105228, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.105228>.

MONTEIRO, R. T. *et al.* Porous and dense alginate/chitosan composite films loaded with simvastatin for dressing applications. **Coatings**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 278, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/coatings14030278>.

MORAES, I. V. M. *et al.* Concentration of hydroalcoholic extracts of graviola (*Annona muricata* L.) pruning waste by ultra and nanofiltration: recovery of bioactive compounds and prediction of energy consumption. **Journal of Cleaner Production**, [S.L.], v. 174, p. 1412–1421, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.11.062>. Acesso em: 15 set. 2025

MORAES, I. V. M. *et al.* UPLC–QTOF–MS and NMR analyses of graviola (*Annona muricata*) leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 26, n. 2, p. 174–179, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.12.001>.

MUTAKIN, M. *et al.* Pharmacological activities of soursop (*Annona muricata* Lin.). **Molecules**, [S.L.], v. 27, n. 4, p. 1201, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27041201>.

NAWAZ, H. *et al.* Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 56, p. e17129, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000417129>.

NAWWAR, M. *et al.* A flavonol triglycoside and investigation of the antioxidant and cell stimulating activities of *Annona muricata* Linn. **Archives of Pharmacal Research**, [S.L.], v. 35, p. 761–767, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12272-012-0501-4>.

NOLASCO-GONZÁLEZ, Y. *et al.* *Annona muricata* leaves as a source of bioactive compounds: extraction and quantification using ultrasound. **Horticulturae**, [S.L.], v. 8, n. 7, p. 560, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/horticulturae8070560>.

NORDSTROM, D. K. *et al.* Negative pH and extremely acidic mine waters from Iron Mountain, California. **Environmental Science and Technology**, [S.L.], v. 34, n. 2, p. 254–258, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/es990646v>.

OLASEHINDE, O. R. *et al.* GC–MS analysis of phytochemical constituents of methanolic fraction of *Annona muricata* leaf and its inhibition against two key enzymes linked to type II diabetes. **Scientific African**, [S.L.], v. 16, p. e01178, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2022.e01178>.

OSAMEDE AIROUYUWA, J. *et al.* Sustainable green extraction of anthocyanins and carotenoids using deep eutectic solvents (DES): a review of recent developments. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 448, p. 139061, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139061>.

OYEDEJIA, O. *et al.* View of biocidal and phytochemical analysis of leaf extracts of *Annona muricata* (Linn.). **International Journal of Sciences: Basic and Applied Research**

(IJSBAR), [S.L.], v. 7, p. 77–87, 2015. Disponível em: <https://gssrr.org/index.php/JournalOfBasicAndApplied/article/view/4963>.

PAIVA, A. *et al.* Natural deep eutectic solvents: solvents for the 21st century. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, [S.L.], v. 2, n. 5, p. 1063–1071, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/sc500096j>.

PAN, Z. *et al.* Intermolecular interactions in natural deep eutectic solvents and their effects on the ultrasound-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua*. **Journal of Molecular Liquids**, [S.L.], v. 326, p. 115283, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115283>.

PANDA, S. *et al.* Aggregation behaviour of biocompatible choline carboxylate ionic liquids and their interactions with biomolecules through experimental and theoretical investigations. **New Journal of Chemistry**, [S.L.], v. 42, n. 9, p. 7105–7118, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C8NJ00336J>.

PAVEGLIO, G. C. **Síntese, caracterização e aplicação de solventes eutéticos em reações envolvendo formação ou drivatização de heterociclos**. 2016. 239 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

PINTO, N. de C. C. *et al.* Antimicrobial *Annona muricata* L. (soursop) extract targets the cell membranes of Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Industrial Crops and Products**, [S.L.], v. 107, p. 332–340, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.054>.

POYER, S. *et al.* Dereplication of acetogenins from *Annona muricata* by combining tandem mass spectrometry after lithium and copper postcolumn cationization and molecular networks. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, [S.L.], v. 33, n. 4, p. 627–634, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jasms.1c00303>.

RAGASA, C. Y.; GALIAN, R.; SHEN, C. Chemical constituents of *Annona muricata* L. leaves. **Der Chemica Sinica**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 382, 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/269403905>. Acesso em: 3 maio 2025.

RASHID, R. *et al.* Green extraction of bioactive compounds from apple pomace by ultrasound assisted natural deep eutectic solvent extraction: optimisation, comparison and bioactivity. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 398, p. 133871, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133871>.

RIBEIRO, A. C. B. *et al.* From mango by-product to food packaging: pectin-phenolic antioxidant films from mango peels. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 193, p. 1138–1150, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.131>.

SANTOS, R. K. S. *et al.* *Annona muricata* leaf extracts obtained with subcritical water and conventional methods: evaluation of antioxidant activities, total polyphenol and rutin contents. **Acta Scientiarum. Technology**, [S.L.], v. 45, n. 1, p. e61153, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v45i1.61153>.

SANTOS, R. K. S. **Utilização de água subcrítica e métodos convencionais de extração para a valorização de resíduos do processamento de graviola (*Annona muricata*)**. 2018. 87f.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

SAVI, L. K. **Desenvolvimento de solventes eutéticos naturais profundos (NADES) e o estudo de suas propriedades físico-químicas**. 2019. 83f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

SHABANI, E. *et al.* Deep eutectic solvents (DES) as green extraction media for antioxidants electrochemical quantification in extra-virgin olive oils. **Talanta**, [S.L.], v. 215, p. 120880, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120880>.

SIK, B. *et al.* Conventional and nonconventional extraction techniques for optimal extraction processes of rosmarinic acid from six Lamiaceae plants as determined by HPLC-DAD measurement. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S.L.], v. 184, p. 113173, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113173>.

SILVA, D. T. da. **Compostos fenólicos de mirtilo (*Vaccinium* sp.): extração com solventes eutéticos profundos naturais e avaliação da atividade em modelo de úlcera gástrica**. 2018. 164 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2018.

SILVEIRA, M. R. S. DA *et al.* **Protocolos para Avaliação das Características Físicas e Físico-Químicas, dos Compostos Bioativos e Atividade Antioxidante do Pedúnculo do Caju**. Comitê Local de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, v. 1, n. 2, p. 33–41, 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1090475/protocolos-para-avaliacao-das-caracteristicas-fisicas-e-fisico-quimicas-dos-compostos-bioativos-e-atividade-antioxidante-do-pedunculo-do-caju>. Acesso em: 14 ago. 2024.

SMITH, R. E.; SHEJWALKAR, P. Potential neurotoxicity of graviola (*Annona muricata*) juice. **Safety Issues in Beverage Production**, [S.L.], v. 1, p. 429–449, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816679-6.00013-9>.

SONG, X. C. *et al.* Discovery and characterization of phenolic compounds in bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaves using liquid chromatography-ion mobility-high-resolution mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.L.], v. 69, n. 37, p. 10856–10868, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c02845>.

SOUZA, P. S. **Extração de compostos bioativos de cascas e sementes de pitomba (*Talisia esculenta*) utilizando solventes eutéticos**. 2022a. 45f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campo Mourão, 2022.

SOUZA, P. S. O. *et al.* Tannins and flavonoids from the flowers of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae). **Química Nova**, [S.L.], v. 45, n. 9, p. 1083–1091, 2022. Disponível em: https://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=9474. Acesso em: 23 fev. 2024

SUGANUMA, K. *et al.* NMR analysis and chemical shift calculations of poly(lactic acid) dimer model compounds with different tacticities. **Polymer Journal**, [S.L.], v. 44, n. 8, p. 838–844, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/pj.2012.106>.

SUN, S. *et al.* Isolation of three new annonaceous acetogenins from graviola (*Annona muricata*) fruit and their anti-proliferation on human prostate cancer cell PC-3. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 26, n. 17, p. 4382–4385, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.06.038>.

SUN, S. *et al.* Novel annonaceous acetogenins from graviola (*Annona muricata*) fruits with strong anti-proliferative activity. **Tetrahedron Letters**, [S.L.], v. 58, n. 19, p. 1895–1899, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.04.016>.

SURESH, P. S. *et al.* Lactic acid-based deep eutectic solvent: an efficient green media for the selective extraction of steroidal saponins from *Trillium govanianum*. **Separation and Purification Technology**, [S.L.], v. 294, p. 121105, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2022.121105>.

TORRES, M. P. *et al.* Graviola: a novel promising natural-derived drug that inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo through altering cell metabolism. **Cancer Letters**, [S.L.], v. 323, n. 1, p. 29–40, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.03.031>.

UEDA, K. M. *et al.* Green designer solvents for boosting the extraction of biocompounds from *Eugenia pyriformis* Cambess leaves. **ACS Food Science and Technology**, [S.L.], v. 2, n. 3, p. 532–540, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.1c00424>.

UEDA, K. M. **Extração de compostos fenólicos provenientes de folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.) empregando solventes eutéticos profundos (DES)**. 2020. 86 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2020.

VARILLA-MAZABA, A. *et al.* Optimization of lignin extraction by response surface methodology from sugarcane bagasse using deep eutectic solvents (DES). **Industrial Crops and Products**, [S.L.], v. 184, p. 115040, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115040>.

VEISAGA, M.-L. *et al.* Anti-proliferative effect of *Annona* extracts on breast cancer cells. **Biocell**, [S.L.], v. 47, n. 8, p. 1835–1852, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37771344/>.

VIEIRA, V. *et al.* Phenolic profile, antioxidant and antibacterial properties of *Juglans regia* L. (walnut) leaves from the Northeast of Portugal. **Industrial Crops and Products**, [S.L.], v. 134, p. 347–355, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.020>.

WANG, M. *et al.* Ecofriendly mechanochemical extraction of bioactive compounds from plants with deep eutectic solvents. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, [S.L.], v. 5, n. 7, p. 6297–6303, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b01378>.

WARDI, G. *et al.* Demystifying lactate in the emergency department. **Annals of Emergency Medicine**, [S.L.], v. 75, n. 2, p. 287–298, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2019.06.027>.

YANG, C. *et al.* Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in graviola (*Annona muricata*) leaves confer protection against prostate cancer. **Carcinogenesis**, [S.L.], v. 36, n. 6, p. 656–665, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv046>.

YANG, H. *et al.* Supercritical fluid CO₂ extraction and simultaneous determination of eight annonaceous acetogenins in *Annona* genus plant seeds by HPLC–DAD method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 140–144, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.09.055>.

YUAN, G.; KEANE, M. A. Liquid phase hydrodechlorination of chlorophenols over Pd/C and Pd/Al₂O₃: a consideration of HCl/catalyst interactions and solution pH effects. **Applied Catalysis B: Environmental**, [S.L.], v. 52, n. 4, p. 301–314, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2004.04.015>.

ZHANG, P. *et al.* Natural deep eutectic solvent-based gels with multi-site interaction mechanism for selective membrane separation of SO₂ from N₂ and CO₂. **Chemical Engineering Journal**, [S.L.], v. 438, p. 135626, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.135626>. Acesso em: 12 ago 2025.

ZHOU, M.; FAKAYODE, O. A.; LI, H. Green extraction of polyphenols via deep eutectic solvents and assisted technologies from agri-food by-products. **Molecules**, [S.L.], v. 28, n. 19, p. 6852, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules28196852>.

ZOU, R. *et al.* Advancements and applications of microwave-assisted deep eutectic solvent (MW-DES) lignin extraction: a comprehensive review. **Green Chemistry**, [S.L.], v. 26, n. 3, p. 1153–1169, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D3GC04501C>.