



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

MARIA ROSA DE MORAES

**AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA
ATEMÓIA (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.)**

**ATEMOYA (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.): EVALUATION AND
CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS**

CAMPINAS
2016

MARIA ROSA DE MORAES

**AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA
ATEMÓIA (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.)**

**ATEMOYA (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.): EVALUATION AND
CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciência de Alimentos.

Thesis presented to the faculty of the Food Engineering of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Ph. D. grade, in the area in Food Science.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Helena Teixeira Godoy

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA MARIA ROSA DE
MORAES E ORIENTADA PELA PROFA.
DRA. HELENA TEIXEIRA GODOY

CAMPINAS
2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

M791a Moraes, Maria Rosa de, 1985-
Avaliação e caracterização dos compostos bioativos da atemóia (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.) / Maria Rosa de Moraes. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Helena Teixeira Godoy.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Annona*. 2. Compostos fenólicos. 3. Cromatografia. 4. Ácidos graxos. 5. Espectrometria de massas. I. Godoy, Helena Teixeira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Atemoya (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.) : evaluation and characterization of bioactive compounds

Palavras-chave em inglês:

Annona

Phenolics

Cromatography

Fatty acids

Mass spectrometry

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Helena Teixeira Godoy [Orientador]

Lígia Bicudo de Almeida Muradian

Juliana Azevedo Lima Pallone

Marta Cristina Teixeira Duarte

Roger Wagner

Data de defesa: 08-07-2016

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy (Orientadora)
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

Profa. Dra. Lígia Bicudo de Almeida Muradian (Membro Titular)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP

Profa. Dra. Juliana Azevedo Lima Pallone (Membro Titular)
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte (Membro Titular)
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – UNICAMP

Prof. Dr. Roger Wagner (Membro Titular)
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

Prof. Dr. Severino Matias de Alencar (Suplente)
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - USP

Profa. Dra. Cláudia Hoffmann Kowalski Schroder (Suplente)
Laboratório Nacional Agropecuário-SP (LANAGRO)

Profa. Dra. Daniela de Queiroz Pane (Suplente)
Centro Universitário – SENAC

A ata da defesa com as respectivas assinaruras dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna.

“Desistir ... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

Cora Coralina

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”

(Marthin Luther King)

DEDICO

Primeiramente a Deus, pela presença constante em todos os momentos da minha vida. Aos meus Filhos, Matheus de Moraes Manzano e Sophia de Moraes Manzano, ao meu marido, Leandro Moreira Manzano e aos meus pais, Maria Otilia Locatelli de Moraes e João César Correia de Moraes. Vocês são muito especiais!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me orientar e ter me dado força, saúde e coragem ao longo dessa trajetória, não permitindo que eu desistisse dos meus objetivos, mesmo em meio a tantos momentos difíceis.

Aos meus filhos, Matheus e Sophia, força de inspiração e incentivo para finalizar mais esta etapa da minha vida. Saiba que vocês foram os maiores presentes que Deus me enviou, não tenho palavras pra descreve-lós, simplesmente amo vocês!

Ao meu marido, pelo amor, companheirismo e dedicação com a nossa família. Nossa trajetória, durante o doutorado, foi marcada por vários acontecimentos importantes: casamento, nascimento da nossa pequena Sophia, muitos momentos felizes e outros de muita dificuldade, mas um dia tenho a certeza que tudo isso será recompensado de alguma forma. Obrigada por tudo, Te amo!

Aos meus pais, exemplo de luta e dignidade e que sempre vibraram com minhas conquistas. São discretos, calados e muitas vezes fechados, mas eu sei que nesses corações existe muito carinho, amor e orgulho. Obrigada por todos os ensinamentos de vida.

Aos demais membros da minha família, principalmente a Terezinha, Paulinho e meu irmão Alessandro, pelo apoio e por investirem e acreditarem no meu sucesso.

À faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP), pela oportunidade concedida e por fornecerem os recursos necessários para o desenvolvimento deste trabalho

A Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy pela acolhida em seu laboratório, dedicação, apoio e amizade, minha sincera gratidão.

A Profa. Dra Marta Cristina Teixeira Duarte e a Profa. Dra Juliana Pallone pela permissão da análise antimicrobiana em seu laboratório e por ter cedido o liofilizador para secagem das amostras, respectivamente.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massas do Instituto de Química pela utilização do LC-MS/MS.

A Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior) pelo auxílio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao meu amigo, Dr. Robert Smith, pesquisador da Food and Drug Administration (FDA) pela parceria, incentivo e auxílio com a língua inglesa.

Aos produtores de atemóia de Pilar do Sul, por ceder gentilmente às amostras utilizadas no trabalho.

A banca examinadora, pelas valiosas correções, sugestões e contribuições para a melhoria da qualidade final desta tese e de futuros artigos.

Aos amigos do Laboratório de Análise de Alimentos, Adriana, Cristiano, Leonardo, Letícia, Suian, Michelly, Guilherme, Alane, Ana Paula, Marcus, Lucas, Stefany, Milene, Marcela e Marla pelos momentos de descontração, auxílio e amizade e que, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Em especial as minhas amigas Fofinhas (Tayse e Thaís), Polly, Dani e Lenaice pela amizade incondicional e constante atenção nos momentos difíceis. Aos meus amigos Well (Cabeça), Jan e Danilo pelos ensinamentos e incentivo nessa fase.

Aos professores e funcionários do Departamento de Ciência de Alimentos, em especial a Marcela, Renata e Seu Dirceu, pelo auxílio, apoio e amizade durante a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente participaram desse trabalho, muito obrigada!

ENFIM, ESSA VITÓRIA NÃO É SÓ MINHA, É NOSSA.

RESUMO

A atemóia (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.) vem despertando interesse por ser uma fruta com características organolépticas e nutricionais atrativas, além de alto potencial de mercado, embora pouco se conheça sobre os compostos bioativos desse híbrido. Desta forma, o objetivo do trabalho foi caracterizar os compostos fenólicos (CF), capacidade antioxidante e a atividade antimicrobiana da casca, polpa e semente de atemóia (safra 2012 e 2013) e avaliar o teor de tocoferóis e o perfil de ácidos graxos das sementes. Um método de extração foi otimizado, utilizando um planejamento centróide simplex, para determinação dos CF, capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana, usando como resposta o teor de compostos fenólicos totais. A caracterização dos compostos fenólicos foi realizada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS) e para efeito de comparação a mesma determinação foi feita em outras frutas das anonáceas (graviola (*Annona muricata*), fruta do conde (*Annona squamosa*), biribá (*Rollinia mucosa*) e pawpaw norte americano (*Asimina triloba*)), assim como os elementos minerais que foram determinados por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). A melhor condição de extração para a casca e polpa da atemóia foi uma mistura de etanol e água (70:30, v/v), enquanto que para a semente foi metanol e etanol (50:50, v/v). O extrato da casca de atemóia apresentou teor de fenólicos totais (CFT) variando de 73 a 111 mg EAG/g peso seco (p.s), elevada capacidade antioxidante, além de apresentar um eficiente controle do *Bacillus cereus* e inibir o crescimento da *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A polpa de atemóia apresentou teor médio de fenólicos totais de 22 mg EAG/g p.s, inibição de *B. cereus* e *E. coli*. Na semente foi encontrado o menor teor de CFT (3,9 mg EAG/g p.s), e seu extrato não apresentou qualquer atividade antimicrobiana. De maneira geral, a atividade antioxidante, antimicrobiana e o conteúdo dos compostos fenólicos da casca foram maiores quando comparado à polpa e a semente da fruta. Os extratos da atemóia apresentaram nove compostos fenólicos dentre os livres (catequina, rutina, epicatequina e ácido clorogênico) e os obtidos após hidrólise ácida (quercetina, e os ácidos *p*-coumárico, 3,4-dihidroxibenzoico, vanílico e ferúlico). Em comparação às demais frutas estudadas, a graviola apresentou as maiores concentrações dos ácidos *p*-coumárico (62,6 µg/g_{p.s}), 3,4-dihidroxibenzoico (16,5 µg/g_{p.s}) e caféico (7,75 µg/g_{p.s}), enquanto que a atemóia apresentou os maiores teores de epicatequina (211 µg/g_{p.s}) e catequina (38,6 µg/g_{p.s}), já o paw paw norte americano se destacou com relação ao ácido clorogênico (48,1 µg/g_{p.s}). Quanto aos constituintes inorgânicos, todas as frutas apresentaram níveis relativamente elevados de potássio (7640-15000 µg/g_{p.s}). A fração lipídica da semente apresentou quantidades significativas de ácidos graxos insaturados (aproximadamente 80 %), com a predominância dos ácidos oléico e linoléico e dos tocoferóis α -tocoferol (24 mg/Kg_{óleo}) e γ -tocoferol (90 mg/Kg_{óleo}). Esses resultados destacam o potencial bioativo das frutas das anonáceas, inclusive da atemóia e incentivam o aproveitamento dos subprodutos da fruta na aplicação em indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas.

Palavras Chave: *Annona*, compostos fenólicos, tocoferóis, ácidos graxos, cromatografia, espectrometria de massas.

ABSTRACT

The atemoya fruit (*Annona cherimoya* Mill x *Annona squamosa* L.) has attracted the market interest due to its organoleptic and nutritional characteristics. However, little is known about its bioactive compounds composition. Therefore, this study aimed to determine the phenolic compounds (PC) profile (free and bounded), the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of the peel, pulp and seed of the atemoya, in two consecutive years (2012 e 2013). The mineral elements were also investigated using optical emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-OES). Moreover, the tocopherol content and the fatty acid profile of the seeds were evaluated. In addition, the characterization of phenolic compounds was performed by coupled liquid chromatography-mass spectrometry (UHPLC-MS / MS) to atemoya and other fruits of Annonaceae (soursop (*Annona muricata*), fruta do conde (*Annona squamosa*), biribá (*Rollinia mucosa*) and north American pawpaw (*Asimina triloba*)). In order to set the solvent composition for PC extraction from the pulp, seed and peel of the atemoya, a multivariate optimization using a simplex centroid design (methanol, water, ethanol) was performed. The best solvent composition for PC extraction was 70:30 of ethanol and water for the peel and the pulp, and 50:50 of methanol and ethanol for the seed. The peel extract had total phenolic content of 73-111 mg GAE / g_{d.w} and showed activity against *Bacillus cereus* growth and inhibition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The pulp extract showed an average content of total phenolic compounds of 22 mg GAE / g_{d.w}, inhibition of *B. cereus* and *E. coli* growth. The seed had total phenolic compounds content of 3.9 mg GAE / g_{d.w}, however, no antimicrobial activity was detected. Nine phenolic compounds were identified in the different parts of the atemoya, being 4 in the non-hydrolyzed extracts (catechin, rutin, epicatechin and chlorogenic acid), and 6 in the hydrolyzed ones (quercetin, p-coumaric acid, 3,4-dihydroxybenzoic, chlorogenic, vanillic and ferulic acid). The catechin and epicatechin were the major compounds found. In general, the antioxidant capacity, antimicrobial activity and the content of all the phenolic compounds were higher in the peel than in the pulp and seed. The seed had high amounts of unsaturated fatty acids (approximately 80%) with a predominance of the oleic and linoleic acid. Moreover, it had 24 e 90.5 mg/Kg_{oil} of α and γ -tocopherol, respectively. Among the other *Annonaceae* fruits, the graviola extracts had the highest concentration of p-coumaric acid (62.6 μ g/g_{d.w}), 3,4-dihydroxybenzoic acid and cafeic acid (16.5 μ g/g_{d.w}), whereas the north American paw paw had the highest content of chlorogenic acid (48.1 μ g/g_{d.w}). With regard to the inorganic constituents, all the fruits studied had high levels of potassium (7640-15000 μ g/g_{d.w}), with the atemoya showing the highest concentrations. These results highlight the bioactive potential of the atemoya and of the other fruits from *Annonaceae*, and show that the use of the atemoya by-products by food, cosmetic and pharmaceutical industries must be encouraged.

Keywords: *Annona*, phenolics, tocopherols, fatty acids, chromatography, mass spectrometry.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	15
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	16
OBJETIVOS	18
OBJETIVO GERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18

CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA

1. ATEMÓIA.....	19
2. COMPOSTOS BIOATIVOS.....	21
3. COMPOSTOS FENÓLICOS	21
3.1 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS.....	24
4. TOCOFERÓIS	25
5. ÁCIDOS GRAXOS.....	27
6. ACETOGENINAS	28
7. ELEMENTOS MINERAIS	29
8. ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	31
8.1 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	31
8.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	32
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	34

CAPÍTULO II: OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO, DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA ATEMÓIA

RESUMO	44
ABSTRACT	45
1. INTRODUÇÃO.....	46
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.1 AMOSTRA.....	47
2.2 EQUIPAMENTOS	48
2.3 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO.....	48
2.4 PLANEJAMENTO DE MISTURA	48
2.5 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	48

2.6 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	49
2.6.1 ENSAIOS DE ABTS.....	49
2.6.2 ENSAIOS DE ORAC.....	49
2.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	50
2.7.1 MICRO-ORGANISMOS	50
2.7.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO TESTE DE MICRODILUIÇÃO	50
2.7.3 LEITURA DOS RESULTADOS	50
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
3.1 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO.....	51
3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	54
3.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	55
3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	56
4. CONCLUSÃO.....	58
5. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	58

CAPÍTULO III: CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS LIVRES E LIGADOS DA ATEMÓIA POR UPLC-MS/MS

RESUMO	63
ABSTRACT	64
1. INTRODUÇÃO.....	65
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	66
2.1 MATÉRIA PRIMA	66
2.2 REAGENTES.....	67
2.3 EXTRAÇÃO	67
2.3.1 EXTRAÇÃO DOS FENÓLICOS LIVRES	67
2.3.2 EXTRAÇÃO DOS FENÓLICOS CONJUGADOS.....	68
2.4 UPLC-MS/MS.....	68
2.5 AVALIAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO	69
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	70
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	70
3.1 ADAPTAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	70
3.2 AVALIAÇÃO DO MÉTODO	71

3.3 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NA POLPA, CASCA E SEMENTE DA ATEMÓIA	72
4. CONCLUSÃO.....	75
5. REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA.....	75

CAPÍTULO IV: COMPOSTOS FENÓLICOS E ELEMENTOS MINERAIS EM FRUTAS *ANNONACEAE*

ABSTRACT	79
1. INTRODUCTION.....	80
2. MATERIAL AND METHODS	81
2.1. PLANT MATERIAL.....	81
2.2. CHEMICALS AND REAGENTS	82
2.3. PHENOLIC COMPOUND EXTRACTION PROCEDURE.....	82
2.4. PHENOLIC COMPOUNDS ASSAY BY UPLC-MS/MS	83
2.5. MINERAL ELEMENTS ANALYSIS	84
2.6. EVALUATION METHODOLOGY OF SOME PARAMETERS	84
2.8. STATISTICAL TREATMENT.....	85
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	85
4. CONCLUSION	89
5. REFERENCES	90

CAPÍTULO V: PERFIL QUANTITATIVO DE TOCOFEROIS E ESTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS DA SEMENTE DE ATEMÓIA

RESUMO	95
1. INTRODUÇÃO.....	97
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	98
2.1 MATÉRIA PRIMA	98
2.2 REAGENTES E SOLUÇÕES PADRÕES	98
2.3 PREPARO DE AMOSTRA	99
2.3.1 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS	99
2.3.2 ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS	99
2.3.3 TOCOFEROIS	100
2.4 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO.....	100

2.4.1 ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS	100
2.4.2 TOCOFEROIS	101
2.5 AVALIAÇÃO DE ALGUNS PARÂMETROS DA METODOLOGIA.....	101
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	102
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
3.1 ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS	102
3.2 TOCOFERÓIS	104
4. CONCLUSÃO.....	106
5. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	106
DISCUSSÃO GERAL	109
CONCLUSÃO GERAL	114
REFERÊNCIA BLIOGRÁFICA.....	115
APÊNDICES	118

INTRODUÇÃO GERAL

O estudo dos compostos bioativos, provenientes especialmente de fontes naturais, tem despertado um grande interesse não só por parte da comunidade científica, mas também da população em geral. Atualmente, um crescente número de pessoas busca prevenir doenças e atingir um melhor estado de saúde por meio da modificação de seus hábitos alimentares e do estilo de vida (DI BARTOLOMEO et al., 2013). Dentro desse contexto, as frutas merecem destaque, pois são amplamente consumidas em função de suas características organolépticas e sensoriais atrativas. Além de nutrir o organismo humano, as frutas contêm compostos biologicamente ativos que, quando administrados em quantidades e qualidade definidas, fornecem benefícios à saúde clinicamente comprovados e disseminados (MCLAUGHLIN, 2008; JIMÉNEZ et al., 2014).

Entre os vários grupos de compostos bioativos presentes nas frutas das anonáceas, os compostos fenólicos, vitaminas, minerais, ácidos graxos e tocoferóis merecem destaque devido, principalmente, as suas funções biológicas, incluindo a capacidade antioxidante, antimicrobiana, antimutagênica e antitumoral (ROESLER et al., 2006; VASCO et al., 2008; LIMA et al., 2010; IGNAT et al., 2011; MORAIS et al., 2015; ALBUQUERQUE et al., 2016). Dentre essas frutas, a atemóia (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.), híbrido interespecífico derivado do cruzamento intencional entre a fruta do conde (*Annona squamosa*) e a cherimóia (*Annona cherimola*), vem despertando interesse por ser uma fruta com alto potencial de mercado, qualidade e a rusticidade da cherimóia, aliadas a facilidade de produção e menor número de sementes em relação à fruta do conde (PINO et al., 2010; LIU et al., 2015). A principal forma de consumo da atemóia é *in natura*, no entanto, por ser uma fruta climatérica bastante perecível pelo alto teor de umidade, rápido amolecimento da polpa e escurecimento da casca (TORRES et al., 2009), pode ser processada na forma de sucos, géleias, compotas e purês. Durante o processamento, uma grande quantidade de resíduos e subprodutos (casca e semente) são gerados, podendo causar poluição ambiental se não forem devidamente tratados.

A geração de resíduos por conta da subutilização da matéria-prima tem se tornado uma preocupação mundial, além de resultar em perdas financeiras para a agroindústria. Muitos desses resíduos podem ser incorporados na dieta humana, uma vez que são ricos em nutrientes e outros compostos com propriedades bioativas (SCHIEBER et al., 2001; SILVA & JORGE, 2014). Além do setor alimentício, as indústrias farmacêuticas e cosméticas têm

buscando soluções para reutilizar estes resíduos, de forma a aproveitar os compostos presentes nos mesmos (BABBAR et al., 2015).

Contudo, estudos sobre os compostos bioativos da atemóia e de seus subprodutos ainda são escassos, tornando, dessa forma, o estudo desta matriz de grande relevância técnica e científica, juntamente com outras frutas da família das anonáceas.

Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar quantitativamente o perfil dos compostos fenólicos, capacidade antioxidante e a atividade antimicrobiana da casca, polpa e semente da atemóia, avaliar o perfil de ácidos graxos e tocoferóis da semente, além de analisar, para fins comparativos, os compostos fenólicos e os constituintes minerais da atemóia e de outras frutas da família das anonáceas, como a graviola (*Annona muricata*), fruta do conde (*Annona squamosa*), biribá (*Rollinia mucosa*) e pawpaw norte americano (*Asimina triloba*).

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALBUQUERQUE, T. G.; SANTOS, F.; SANCHES-SILVA, A.; OLIVEIRA, M. B.; BENTO, A. C.; COSTA, H. S. Nutritional and phytochemical composition of *Annona cherimola* Mill. fruits and by-products: Potential health benefits. **Food Chemistry**, v. 193, p. 187-195, 2016.

BABBAR, N.; OBEROI, H. S.; SANDHU, S. K. Therapeutic and Nutraceutical Potential of Bioactive Compounds Extracted from Fruit Residues. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, p.319-337, 2015

DI BARTOLOMEO, F.; STARTEK, J.B.; VAN DEN ENDE, W. Prebiotics to fight diseases: reality or fiction? **Phytherapy Research**, v. 27, p. 1457-1473, 2013.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v.126, p.1821–1835, 2011.

LIMA, L. A. R. S.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. **Food Chemistry**, Reading, v. 122, n. 4, p. 1.129-1.138, 2010.

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

LIU, T. T.; CHAO, L. K.P.; PENG, C. W. et al. Effects of processing methods on composition and functionality of volatile components isolated from immature fruits of atemoya. **Food Chemistry**, v, 202, p. 176-183, 2016.

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

MORAIS, D. R.; ROTTA, E. M.; SARGI, S. C. SCHMODT, E. M. et al. Antioxidant activity, phenolics and UPLC–ESI(–)–MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. **Food Research Internacional**. v.77, p.392-399, 2015.

PINO, J. A. (2010). Annona Fruits **Handbook of Fruit and Vegetable Flavors** (pp. 229-246): John Wiley & Sons, Inc.

ROESLER. R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; PASTORE, G. Evaluation of the antioxidant properties of the Brazilian Cerrado fruit *Annona crassiflora* (Araticum). **Journal of Food Science**. v.71, p.102-107, 2006.

SCHIEBER, A.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds — recent developments. **Trends in Food Science & Technology**, v. 12, p. 401-413, 2001.

SILVA, A. C.; JORGE, N. Bioactive compounds of the lipid fractions of agro-industrial waste. **Food Research International**, v. 66, p. 493-500, 2014.

TORRES, L. M. A. R.; SILVA, M. D.; GUAGLIANONI, D. G. et al. Effects of heat treatment and calcium on postharvest storage of atemoya fruits. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, p,359-368, 2009.

VASCO, C. RUALES, J. KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v. 111, p. 816-823, 2008.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Caracterizar, identificar e quantificar os compostos bioativos da casca, polpa e semente da atemóia (safras 2012 e 2013), bem como, avaliar sua capacidade antioxidante e antimicrobiana, no intuito de gerar novos conhecimentos sobre possíveis princípios ativos naturais de importância para a indústria alimentícia e farmacêutica.

Objetivos específicos

- Otimizar o solvente extrator, através de um planejamento centróide simplex, utilizando como resposta a concentração dos compostos fenólicos totais da casca, polpa e semente da atemóia;
- Determinar a quantidade de compostos fenólicos totais, nas diferentes partes da fruta;
- Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro*, por meio dos métodos ORAC e ABTS;
- Avaliar a atividade antimicrobiana através da determinação da concentração inibitória mínima;
- Caracterizar os principais compostos fenólicos livres e ligados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (UHPLC-MS/MS);
- Quantificar os elementos minerais por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES);
- Caracterizar e quantificar os tocoferóis presentes nas sementes da atemóia por cromatografia líquida de alta eficiência, acoplado a um detector de fluorescência;
- Avaliar o perfil de ácidos graxos das sementes por cromatografia gasosa acoplado a um detector de ionização de chama (GC-FID) e confirmação dos mesmos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS);
- Determinar os compostos fenólicos e os elementos minerais em outras frutas das anonáceas (graviola, fruta do conde, biriba e paw paw norte americano);
- Verificar a influência de duas safras no teor dos compostos bioativos analisados.

CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA

1. Atemóia (*Annona Cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.)

O consumo de frutas exóticas está aumentando em todo o mundo devido ao reconhecimento de seu elevado valor nutricional e de suas propriedades benéficas (LOIZZO et al., 2012). Nesse sentido, a atemóia (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.), pertencente à família *Annonaceae*, a qual engloba cerca de 135 gêneros, sendo o gênero *Annona* considerado o mais importante dessa família, vem despertando interesse por ser uma fruta com alto potencial de mercado, mas de distribuição ainda restrita (COUVREUR et al., 2011; ALMEIDA et al., 2011; LIU et al., 2015).

A atemóia é um híbrido interespecífico derivado do cruzamento intencional entre uma fruta tropical, a fruta do conde, muito cultivada em regiões quentes, e uma fruta subtropical, a cherimóia, considerada uma das frutas mais saborosa do mundo, nativa das regiões andinas (PINO, 2010)

Por ser um híbrido, apresenta como principais características a sua adaptação climática intermediária, a qualidade e a rusticidade da cherimóia, aliadas a facilidade de produção e menor número de sementes da fruta do conde. Segundo Donadio (1997), por sua maior versatilidade e maior adaptação às condições tropicais e subtropicais, a produção de atemóia tende a crescer no Brasil.

O cruzamento da atemóia foi realizado por P. J. Webster em 1907 na Flórida-EUA (PINTO et al., 2005), sendo introduzida em São Paulo na década de 1950 pelo Instituto Agrônomo de Campinas e, somente na década de 1990 começou a ser explorada comercialmente (LEMOS et al., 2014).

No Brasil, as culturas de atemóia encontram-se localizadas em pontos com diferentes características climáticas, sendo o estado de São Paulo o maior produtor, responsável por 44% da produção, seguido por Minas Gerais, Paraná e Bahia, cada um respondendo por 18,8% da produção (LEMOS et al., 2014). Os cultivos paulistas ocorrem em zonas de clima mais ameno, como Itapetininga, Paranapanema, Sorocaba e Botucatu, sendo cultivadas principalmente as variedades Thompson, Gefner, Pink's Mamooth e African pride. A cultura da atemóia apresentou expansão significativa na área cultivada nos últimos anos, motivada, principalmente pelo valor de mercado do fruto e seu potencial para exportação. No Brasil, aproximadamente 1500 ha são empregados para o cultivo desta cultura, com produção

variando entre 12 a 15 t/ha de frutos comerciais, ou seja, aquele com boa formação e peso superior a 300 g., porém poucos são os dados oficiais de produção (LEMOS et al., 2014)

Os frutos de atemóia apresentam a casca de cor verde-escura/amarelada com textura rugosa e pontiaguda, a polpa branca, cremosa e doce, geralmente apresenta poucas sementes, que possuem cor escura (Figura 1). Seus frutos podem atingir facilmente peso superior a 300 g. Além disso, são conhecidos por seu sabor e aroma excepcional, apresentando características sensoriais superiores a fruta do conde e a cherimóia (MARCELLINI, et al., 2003; LIU et al., 2016).



Figura 1: Frutos de Atemóia. Foto: Gabriel Vicente Bitencourt de Almeida.

A atemóia é um fruto climatérico bastante perecível pelo alto teor de umidade, rápido amolecimento da polpa e escurecimento da casca, sendo suscetível a danos mecânicos durante a colheita, transporte e armazenamento, o que representa um obstáculo para a comercialização e manutenção da qualidade da mesma (LIMA, 2010). Outro fator limitante é o uso de temperaturas de armazenamento inferiores a 10 °C, o que resulta em *chilling injury*, responsável pelo escurecimento e endurecimento da casca, deficiência na produção de aroma e polpa farinhenta, tornando-se impróprios para a comercialização e o consumo (GUTIERREZ et al., 1992; TORRES et al., 2009).

Do ponto de vista fisiológico, as frutas da família das anonáceas são descritas com elevados teores de água (acima de 70%), carboidratos e proteínas e baixo teor de colesterol lipídeos (BARRECA et al., 2011). No caso da atemóia, por exemplo, a composição nutricional é constituída por 72,7% de umidade, 25,3% de carboidratos, 2,1% de fibras, 1,0 % de proteínas, 0,3 % de lipídeos, 0,7% de cinzas, 23 mg de cálcio /100g e 25 mg de magnésio /100g (TACO, 2011), perfazendo 97 Kcal. Valores semelhantes foram relatados para a cherimóia, no entanto, outras análises também foram realizadas alcançando 35,2 mg de

fósforo/100g, 0,6 mg de ferro/g, 15,5 mg vitamina C/100g, 1,28 mg niacina/100g e 0,11 mg de tiamina/100 (BADIE; SCHAUSS, 2009).

Nesse sentido, a ingestão de frutas do gênero *Annona* pode facilmente fornecer os principais eletrólitos celular do corpo humano como sódio [Na^+], potássio [K^+], magnésio [Mg^{2+}], fosfato de [PO_4^{-3}], sulfato de [SO_4^{-2}], bicarbonato de [HCO_3^-] e menores quantidades de cloreto de [Cl^-] e cálcio [Ca^{+2}] (CLERICI & CARVALHO-SILVA, 2011).

2. Compostos Bioativos

Entre os vários grupos de compostos bioativos presentes na família das anonáceas, os compostos fenólicos, vitaminas, minerais, ácidos graxos e tocoferóis se destacam devido, principalmente, as suas funções biológicas, incluindo a capacidade antioxidante, antimicrobiana, antimutagênica e antitumoral (ROESLER et al., 2006; VASCO et al., 2008; IGNAT et al., 2011; MORAIS et al., 2015; ALBUQUERQUE et al., 2016). Adiciona-se a esta lista as acetogeninas, um dos principais constituintes bioativos encontrados em gêneros específicos da *Annonaceae* (MCLAUGHLIN, et al., 2008; BERMEJO et al., 2005).

Os compostos bioativos, de maneira geral, são encontrados nas frutas *in natura*, ou processadas na forma de sucos, géleias, compotas e purês. No entanto, durante o processamento, uma grande quantidade de resíduos de alimentos e subprodutos são gerados, podendo causar poluição ambiental se não forem devidamente tratados (PARNIAKOV et al., 2016).

Em face dessa realidade, nos últimos anos, a indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética têm buscado soluções para reutilizar estes resíduos, de forma a aproveitar os compostos bioativos presentes nos mesmos, sendo assim, necessário o estudo da composição das frações menos aproveitadas da fruta, como a casca e a semente (PESCHEL et al., 2006; GORINSTEIN et al., 2011).

No entanto, estudos sobre os compostos bioativos da atemóia e de seus subprodutos ainda são escassos, tornando, dessa forma, o estudo desta matriz de grande relevância técnica e científica, juntamente com outras frutas do gênero *Annona*.

3. Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados por plantas durante o desenvolvimento destas e em respostas às condições de estresse como infecção, ferimento, radiação UV, ataque de insetos e patógenos, dentre outras (KHODDAMI et al., 2013). Em

alimentos são responsáveis pela cor, sabor, adstringência e estabilidade oxidativa, além de estarem envolvidos no processo de crescimento e reprodução das plantas (SHAHIDI & NACZK, 2004; ANGELO; JORGE, 2007).

Quimicamente são definidos como um grupo bastante diversificado de substâncias que apresentam em sua estrutura um anel aromático, tendo um ou mais grupos hidroxilas, ou outros grupos funcionais. De acordo com sua estrutura química, podem ser divididos em dois grandes grupos: os flavonóides (Figura 2), subdivididos em flavonas, flavanois, flavonois, flavanonas, isoflavonas e antocianidinas, e os não flavonoides, que compreendem os grupos dos ácidos fenólicos (Figura 3), ligninas, taninos e estilbenos (DAI; MUMPER, 2010; HAMINIUK et al., 2012).

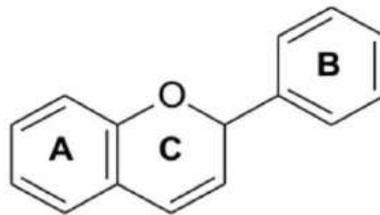
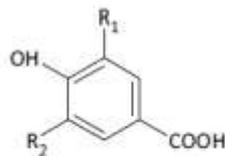


Figura 2: Estrutura química dos flavonóides. Fonte: Angelo et al., 2007.



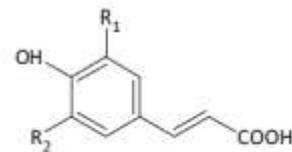
(A)

Ácido p-hidroxibenzóico: $R_1 = R_2 = H$

Ácido vanílico: $R_1 = CH_3O$, $R_2 = H$

Ácido siríngico: $R_1 = R_2 = CH_3O$

Ácido gálico: $R_1 = R_2 = OH$



(B)

Ácido p-cumárico: $R_1 = R_2 = H$

Ácido caféico: $R_1 = H$, $R_2 = OH$

Ácido ferúlico: $R_1 = CH_3O$, $R_2 = H$

Ácido sinápico: $R_1 = R_2 = CH_3O$

Figura 3: Estrutura química dos ácidos fenólicos. Fonte: Angelo et al., 2007.

Os fenólicos na forma livre representam a menor fração, enquanto que a maior parte destes, encontram-se, muitas vezes, na forma de complexos ligados a polímeros da parede celular (carboidratos e proteínas) dos vegetais, por meio de ligações éster e glicosídicas, originando estruturas que podem ser bastante insolúveis, e que dessa forma, necessitam de um processo de hidrólise (ácido, básico ou enzimático) visando à liberação desses fenólicos complexados (NACZK & SHAHIDI, 2004; IGNAT et al., 2011; AHMAD et

al., 2016). A hidrólise sob-refluxo com HCl (1-2 M) tem sido recomendada desde que cuidados com tempo e temperatura de extração sejam observados, caso contrário pode ocorrer perda de até 50% dos compostos (NUUTILA et al., 2002; STALIKAS, 2007).

Os compostos fenólicos presentes em alimentos de origem vegetal recebem atenção considerável, devido, principalmente, as suas funções biológicas, incluindo atividade antioxidante, antimutagênica e antitumoral. Estudos demonstram seu potencial no combate aos radicais livres, que causam estresse oxidativo e, conseqüentemente, danos a tecidos e biomoléculas do nosso organismo, exercendo assim, importante papel na prevenção de distúrbios patológicos, tais como a aterosclerose, disfunção cerebral e câncer (MCLAUGHLIN, et al., 2008; IGNAT et al., 2011; DEL RIO et al., 2013). Por estas razões, um grande esforço tem sido realizado para caracterizar os fenólicos presentes em diferentes plantas (MCLAUGHLIN, et al., 2008; IGNAT et al., 2011).

As frutas do gênero *Annona* contêm considerável quantidade de compostos fenólicos totais (CFT), sendo que Vasco et al. (2008) relataram que o teor de CFT foi de 323 mg_{AG}/100 g de polpa fresca de cherimóia. Já Loizzo et al. (2012) estudando a mesma cultivar obtiveram 14,6 e 12,6 mg ácido clorogênico/100 g de casca e polpa fresca, respectivamente. Da Silva et al. (2014) apresentaram um teor de CFT de 28,86 mg_{AG}/g s.s. para polpa de graviola (*Annona muricata*) e Roseler et al. (2007) relataram 20,3 mg_{AG}/g s.s. em polpa de araticum. O teor destes compostos depende do grau de maturação, variedade, clima, composição do solo, localização geográfica e condições de armazenamento, dentre outros fatores (HAMINIUK et al., 2012).

No que diz respeito ao perfil dos flavonoides exibido pelo gênero *Annona* foram isolados e identificados flavonas (luteonina) e flavonóis (kaempferol, quercetina, ramnetina, rutina e isoramnetina) nas espécies *Annona crassiflora*, *A. tomentosa*, *A. monticola*, *A. dolichorcharpa* (SANTOS, SALATINO, 2000). No caso da fruta do conde, Wu et al. (1997) relataram a presença dos fenólicos catequina, ácido clorogênico, eugenol e ácido gálico.

Em suco de cherimóia identificou-se dímeros e trímeros de proantocianidina, catequina e rutina (BARRECA et al., 2011). Garcia-Salas et al. (2015) analisaram 21 compostos na polpa de graviola, 37 em casca e 22 em sementes, sendo que a maioria dos compostos identificados foram as catequinas e procianidinas.

Baskaran et al. (2016) identificaram no extrato da fruta do conde os seguintes compostos fenólicos: ácido quínico, catequina, quercetina, ácido benzóico, procianidina B1 e procianidina C1, entre outros.

3.1 Extração e análise dos compostos fenólicos

A extração é o principal passo antes da análise para a recuperação e isolamento de fitoquímicos bioativos de tecidos vegetais. Esse processo é influenciado pela característica química do analito, pelo método de extração utilizado, tamanho das partículas, assim como a presença de substâncias interferentes (RODRIGUEZ-SOLANA et al., 2015). A fim de obter uma extração eficiente, com altas concentrações dos compostos desejados e com a mínima degradação, a escolha do solvente extrator, juntamente com a técnica de extração utilizada, torna-se de grande importância.

Sendo assim, o solvente ideal deve apresentar máxima seletividade, compatibilidade com as propriedades dos materiais extraídos e a maior capacidade de extração (LOPES et al., 2011; HANDA et al., 2016). Embora o rendimento máximo de extração de compostos fenólicos seja necessário para satisfazer as exigências das indústrias alimentícias, farmacêuticas ou até mesmo dos processos analíticos, os riscos ambientais e os relacionados à saúde também devem ser considerados ao selecionar um solvente de extração. Neste contexto, os solventes de extração “verde”, tais como água e etanol ganham mais importância que outros solventes “não verdes” como o metanol, acetona e acetonitrila (CHEMAT et al., 2012; HANDA et al., 2016).

Técnicas tradicionais como extração por Soxhlet, maceração, sonicação e extração sólido-líquido são os procedimentos comumente utilizados para obtenção dos compostos fenólicos, principalmente pela facilidade de uso, eficiência e ampla aplicabilidade (STALIKAS, 2007). No entanto, técnicas alternativas como extração com fluidos supercríticos, extração por microondas e extração acelerada por solvente (ASE) têm sido desenvolvidas (KHODDAMI, et al., 2013), visando melhorar a eficiência de extração, com menor volume de solvente e tempo de análise.

Em particular, o uso da ASE é uma técnica de extração realizada a elevada temperatura e pressão, na qual as amostras são colocadas em uma célula, que por sua vez é preenchida pelo solvente pressurizado, enquanto o sistema é mantido sob aquecimento (FLANAGAN, 2007). O aumento na temperatura promove maior solubilidade dos analitos, diminui a viscosidade do solvente (permitindo melhor penetração na amostra), e também auxilia no rompimento de interações de *van der waals*, ligações de hidrogênio e interação dipolo-dipolo, responsáveis pela ligação do analito à matriz. A pressão elevada é responsável por manter o solvente no estado líquido mesmo em temperaturas acima do seu ponto de ebulição (RICHTER et al., 1996). Esses fatores permitem maior reprodutibilidade, eficiência,

rapidez e menor volume de solvente frente às técnicas convencionais de preparo de amostra (RICHARDS, et al., 2014; CAI et al., 2016).

Para melhorar a eficiência do processo de extração o uso do planejamento estatístico, utilizando uma otimização multivariada, é uma ferramenta muito utilizada, pois possibilita a redução do tempo e do custo de análise, bem como permite verificar os efeitos de interação entre os fatores estudados, o que não é possível quando se utiliza uma otimização univariada (FERREIRA et al., 2007; COUTINHO et al., 2015; SILVEIRA et al., 2016).

Após a extração, normalmente utiliza-se a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) para a caracterização do perfil dos compostos fenólicos (JAKOBEK, et al., 2015; TANG et al., 2016). Apesar do sucesso da técnica, a mesma precisa de um acurado preparo de amostra e, geralmente, possui um tempo de análise demorado, devido à complexidade da matriz.

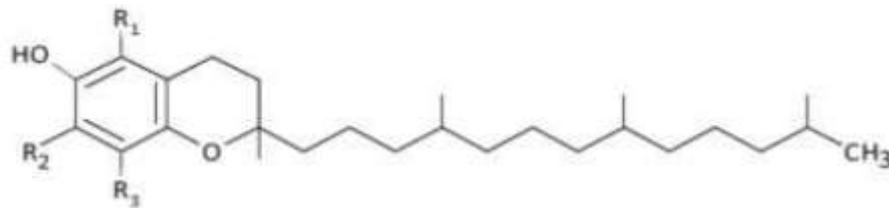
A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS) tem sido amplamente aceita como a principal ferramenta na separação, identificação, caracterização estrutural e análise quantitativa dos compostos fenólicos (ALARCÓN-FLORES et al., 2013; MOTILVA et al., 2013; BASKARAN et al., 2016). Nesse sistema, a fonte de ionização por Electrospray (ESI) no modo negativo mostrou ser mais eficiente e sensível para a caracterização dos ácidos fenólicos e flavonoides, em geral (SPINOLA et al., 2015). Além disso, o uso de monitoramento seletivo de reações (SRM) na espectrometria de massas sequencial (MS^n), utilizando como analisador um triplo quadrupolo (QqQ), tem sido considerado uma ferramenta analítica eficiente, por exibir características excelentes, tais como seletividade, especificidade e sensibilidade (LIU et al., 2010; BATAGLION et al., 2015).

4. Tocoferóis

Os tocoferóis são constituídos de dois anéis, um fenólico e outro heterocíclico, ligados a uma cadeia lateral saturada composta por 16 carbonos, sendo classificados como α -, β -, γ -, δ -tocoferol, dependendo do número e da posição dos grupos metilas ligados ao anel aromático (Figura 4) (DUNFORD, 2001; MALACRIDA, 2009).

São encontrados na maioria dos óleos vegetais e tem como função proteger os ácidos graxos insaturados da oxidação lipídica, principalmente pela sua capacidade em doar hidrogênio aos radicais livres lipídicos, fazendo com que a oxidação em cadeia seja interrompida (SZYMANKA & KRUK, 2008).

A vitamina E, termo genérico utilizado para designar diferentes compostos com estruturas semelhantes, pode ser dividida em dois principais grupos, os tocoferóis e os tocotrienóis, e é considerada uma importante classe de antioxidantes lipossolúveis, sendo o α -tocoferol a forma mais abundante na natureza e com maior atividade biológica (HERRERA & BARBAS, 2001). O efeito cardio-protetor promovido pela vitamina E está associado à inibição da oxidação do colesterol LDL, demonstrando um importante passo no processo aterogênico (ELMADFA & WAGNER, 2003).



Tocoferóis	R1	R2	R3
α -tocoferol	CH3	CH3	CH3
β -tocoferol	CH3	H	CH3
γ -tocoferol	H	CH3	CH3
δ -tocoferol	H	H	CH3

Figura 4: Estrutura química do tocoferol. Fonte: MALACRIDA, 2009.

Diversas técnicas têm sido aplicadas para separação, purificação e quantificação de tocoferóis e tocotrienóis nas mais diversas matrizes. Entre as técnicas empregadas, encontram-se a cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar. Desde que foi utilizada para a análise de antioxidantes lipídicos, a CLAE tem sido extensivamente aplicada e é preferida pela grande maioria dos pesquisadores da área (GUINAZI, 2009).

Até o momento, não foram relatados estudos sobre a composição e quantificação desses compostos na Atemóia, entretanto, estudos foram realizados com outras frutas das anonáceas. O teor de α -tocoferol em sementes, cascas e polpas de cherimóia (*Annona cherimola*) foram de 1,1mg/100g, 0,31mg/100g e 0,069 mg/100g fruto, respectivamente. (ALBUQUERQUE et al., 2016). Garcia-Salas et al. (2016), estudando a composição lipídica de diferentes cultivares de cherimóia, verificaram que as maiores concentrações de tocoferóis encontram-se na semente do fruto, onde foram quantificados α -tocoferol e δ -tocoferol; já na casca, somente o α -tocoferol foi encontrado, enquanto que na polpa, não foram detectados

tocoferóis pelos referidos autores . No entanto, Masson et al. (2008) verificaram que em óleos extraídos das sementes da cherimóia, o principal tocoferol encontrado foi o γ -tocoferol com concentração igual a 300 mg Kg^{-1} , valor discrepante quando comparado ao óleo da graviola, que apresentou $7,1 \text{ mg Kg}^{-1}$ (da SILVA & JORGE, 2014).

Da Silva e Jorge (2014) avaliando os compostos bioativos das frações lipídicas de resíduos agroindustriais verificaram que o teor de α -tocoferol no óleo da semente da graviola foi maior ($22,1 \text{ mg Kg}^{-1}$) quando comparado aos demais óleos das sementes de frutas, como uva ($11,8 \text{ mg Kg}^{-1}$), melão ($20,5 \text{ mg Kg}^{-1}$) abóbora ($7,3 \text{ mg Kg}^{-1}$), com exceção da goiaba ($45,8 \text{ mg Kg}^{-1}$).

5. Ácidos Graxos

O estudo dos ácidos graxos de frutas e de seus subprodutos tem sido foco de diversas pesquisas nos últimos anos, devido à presença de compostos bioativos que desempenham um fator preventivo em várias doenças cardiovasculares e degenerativas (AYALA-ZAVALA et al., 2011; FADAVI et al., 2006; VILLAVERDE et al., 2013). Além desse fator, a caracterização e o isolamento de fitoquímicos de fontes alternativas de óleos vegetais tornam-se um campo bastante promissor para potencial uso nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos (da SILVA & JORGE, 2014).

Os óleos vegetais são classificados em saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, dependendo da presença e número de duplas ligações na cadeia de ácidos graxos. A alimentação rica em ácidos graxos insaturados, como o ácido oléico, linolênico e linoléico, por exemplo, auxilia na diminuição plasmática das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), sem redução das lipoproteínas de alta densidade (HDL), além de reduzir os níveis de triglicerídeos plasmáticos, promovendo um efeito benéfico à saúde, como prevenção de câncer e doenças cardiovasculares (BINKOSKI et al., 2005; AYALA-ZAVALA et al., 2011).

Não existem relatos, até o momento, de dados relacionados à composição de ácidos graxos presentes no óleo da semente da atemóia. Porém, outros trabalhos como o de Rana (2014) verificou o perfil dos ésteres metílicos na semente da fruta do conde (*Annona squamosa*) e verificou que os principais ácidos graxos insaturados foram o ácido oléico (47,4%) e linoléico (22,9%), seguido dos ácidos graxos saturados (25,7%), sendo representados principalmente pelo ácido palmítico e ácido esteárico. Da Silva e Jorge (2014) também observaram a predominância de ácidos graxos insaturados nos óleos de sementes de

2012). Dessa forma, a necessidade de métodos analíticos eficientes que permitam a caracterização das ACGs e a determinação da atividade antiproliferativa, juntamente com estudos patológicos, possivelmente, causados pelo consumo dessas substâncias, é de grande importância.

As acetogeninas de *Annonaceae* são prontamente solúveis em muitos solventes orgânicos, sendo assim, extrações com etanol ou metanol, seguido de partição líquido-líquido, são comumente empregadas (GU et al., 1997; POTTS et al., 2012).

Para a separação e quantificação das acetogeninas pode-se utilizar a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC/MS), por ser um método conveniente para a análise de diferentes classes de metabólitos, particularmente, aqueles detectados com dificuldade por UV ou outros métodos espectroscópicos (GU et al. 1997). Vale ressaltar que, as acetogeninas, por terem “cromóforos pobres”, não são detectadas facilmente por UV (220 nm ou 210) na presença de grandes quantidades de impurezas, o que torna o processo de limpeza da amostra necessário. Para a limpeza desses compostos pode-se empregar coluna preparativa (C18) em cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa (RP-HPLC) (GU et al., 1997; POTTS et al., 2012).

O sistema de RP-HPLC-MS/MS com ionização por eletrospray no modo positivo foi usado na análise das ACGs em amostras *in natura* por Gu et al. (1997), que observaram no espectro a presença de íons moleculares com aduto de m/z 639 ($[M+H]^+$), 656 ($[M+NH_4]$) e 661 ($[M+Na]^+$). Já Champy et al. (2009) avaliaram um método rápido, sensível e preciso, utilizando MALDI-TOF-MS, que possibilita a redução do preparo da amostra e do efeito matriz.

7. Elementos Minerais

Os minerais estão presentes nos sistemas biológicos e desempenham importantes papéis na manutenção do bom funcionamento dos organismos vivos, participando como cofatores de enzimas, transporte de oxigênio, combate a formação de radicais livres, atividade hormonal e organização estrutural de macromoléculas (SPAZIANI et al., 2006), sendo as frutas consideradas as principais fontes de minerais necessários na dieta humana (HARDISSON, et al., 2001).

Para a determinação desses elementos diferentes técnicas têm sido utilizadas, tais como a espectrometria de absorção atômica de chama (FAAS), a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS), espectrometria de emissão óptica com plasma

indutivamente acoplado (ICP-OES) e a espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) (RADWAN & SALAMA, 2006; BERTO et al., 2015; MIR-MARQUÉS et al., 2015). No entanto, a ICP-OES e a ICP-MS têm sido amplamente empregadas para a caracterização completa do perfil de minerais em alimentos (MIR-MARQUÉS et al., 2015), pois permitem a determinação simultânea e/ou sequencial de vários elementos químicos, ampla faixa linear de trabalho e baixos limites de detecção.

Na literatura existem alguns trabalhos que abordam os elementos minerais nas frutas das anonáceas. De acordo com De Souza et al. (2012) a polpa de graviola apresentou 11,8 mg de fósforo, 163 mg de potássio, 2,2 mg de cálcio, 10,6 mg de magnésio e 0,42 mg de ferro em 100 gramas de fruta fresca, valores superiores comparado ao jenipapo e ao murici, com exceção do cálcio. Enquanto que a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO (2011) apresentou valores similares para a polpa de graviola.

Biriba (*Rollinia mucosa*) apresentou quantidades significativas de minerais na polpa, casca e semente do fruto quando comparado a outras frutas nativas da Amazônia como o cubiu e a sapota, sendo quantificados na polpa os seguintes minerais: manganês (0,33 mg /100g), zinco (1,03 mg /100g), cobre (1,04 mg /100g), ferro (1,53 mg /100g), magnésio (102 mg /100g), sódio (177 mg /100g) e fósforo (19 mg /100g) todos expressos em base úmida (BERTO et al., 2015).

Almeida et al. (2009) classificaram a fruta do conde (*Annona squamosa*) como excelente fonte de cobre (0,22 mg/ 100 g), enquanto que para potássio, magnésio, cobre e cálcio a graviola e a ata foram classificadas como boa fonte desses minerais por fornecerem de 10 a 19% da ingestão diária recomendada (IDR), já o conteúdo de sódio e zinco foi menor que 10% da IDR. Nesse sentido, o consumo regular de frutas das anonáceas pode contribuir com as necessidades médias diárias de minerais para adultos (homens e mulheres, de 19 a 70 anos), sendo estas: Mn, 1,8 a 2,3 mg / dia; Zn, 8 a 11 mg / dia; Cu, 0,9 mg / dia; Fe, 8-18 mg / dia; Mg, 310 a 400 g / dia; Na, 1300 a 1500 mg / dia; e P, 700 mg / dia (Institute of Medicine, 2006).

8. Atividades biológicas

8.1. Capacidade antioxidante

O estudo da atividade antioxidante de compostos presentes naturalmente na família *Annonaceae* vem sendo foco de diversos trabalhos científicos devido à sua representatividade no combate a doenças, como o retardamento do processo de aterosclerose, prevenção da obstrução das artérias e redução dos processos de morte celular. Estas atividades estão relacionadas a uma série de compostos naturais presentes nas frutas dessa família, como as vitaminas, minerais, ácidos graxos, tocoferóis, compostos fenólicos e as acetoginas (WU et al. 1997; MOURE et al., 2001; BADIE; SCHAUSS, 2009; LOIZZO, et al., 2012).

Os antioxidantes podem ser definidos como quaisquer substâncias que, presentes em baixas concentrações, quando comparado a um substrato oxidável, retardam ou inibem a oxidação desse substrato de maneira eficaz (SIES; STHAL, 1995). A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou em excesso, devido alguma disfunção biológica (BARREIROS, 2006).

Os radicais livres são moléculas ou átomos contendo um ou mais elétrons não pareados em seu orbital, livres para se ligarem a qualquer outro elétron. O não emparelhamento de elétrons na última camada de valência torna esses átomos ou moléculas altamente instáveis e quimicamente muito reativos, capazes de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora de elétrons (MACHLIN, BENDICH, 1987; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

A produção de radicais livres envolve várias organelas celulares, como mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos, núcleo, retículo endoplasmático e membranas (MACHLIN, BENDICH, 1987). O dano causado a esses componentes celulares se acumula, com o passar dos anos, e contribui para a degeneração de células somáticas e indução de doenças crônico-degenerativas, especialmente associadas com o avanço da idade, destacando-se câncer, aterosclerose, doenças inflamatórias, mal de Parkinson, mal de Alzheimer e catarata (LANGSETH, 2000; LANNUZEL et al., 2008; MCLAUGHLIN, 2008).

Vários métodos têm sido utilizados para determinar e comparar a atividade antioxidante de frutas, devido à complexidade dos substratos analisados e à diversidade química dos compostos antioxidantes presentes nessa matriz. Os métodos disponíveis diferem

em relação ao mecanismo de ação, às espécies alvo, as condições reacionais e na forma como os resultados são expressos, não existindo um procedimento metodológico universal para avaliar a capacidade antioxidante o que impõe a necessidade da realização de diferentes ensaios, com fundamentos e mecanismos diferentes (REZAIRE et al., 2014; PAZ et al., 2015). Os métodos mais comuns e amplamente utilizados para tais ensaios são: ABTS (capacidade sequestradora do radical 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzoatiazolina-6-ácido sulfônico); DPPH (atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil); FRAP (poder antioxidante de redução do íon férrico) e ORAC (capacidade de absorção do radical oxigênio), que envolvem a conversão dos radicais livres em moléculas menos ativa ou não radicalar usando espectrometria UV-VIS (LOIZZO et al., 2012; WOLFE et al., 2008).

Os métodos podem ser classificados de acordo com os mecanismos de reação em métodos de transferência de átomos de hidrogênio, este consiste na determinação da capacidade antioxidante em sequestrar radicais livres pela doação de um átomo de hidrogênio, tais como o ORAC, ou métodos de transferência de elétrons, onde medem a habilidade de um antioxidante em reduzir qualquer composto por meio da transferência de um elétron, neste caso pode-se citar o DPPH, FRAP e ABTS (APAK et al., 2007).

Não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliaram a capacidade antioxidante da polpa da atemóia e de seus subprodutos. No entanto, outras frutas da mesma família demonstraram ser muito promissoras e com alta atividade antioxidante, como a cherimóia, graviola, fruta do conde e araticum (GUPTA-ELERA et al., 2011; SPINOLA et al., 2015; ALBUQUERQUE et al., 2016).

8.2. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana de óleos essenciais, extratos de espécies vegetais e de resíduos gerados pelo processamento de frutas têm sido foco de muitas pesquisas nos últimos anos (Al-REZA et al., 2010; RABÊLO et al., 2014). Esse fato deve-se, principalmente, a resistência dos micro-organismos aos antibióticos e antifúngicos produzidos comercialmente, tornando-se assim uma grande ameaça mundial (GONZÁLEZ-ZORN & ESCUDERO, 2012).

Os principais gêneros bacterianos Gram positivos que apresentam resistência aos antimicrobianos são *Staphylococcus* e *Enterococcus* e os principais gêneros/espécies bacterianos (as) Gram negativos relatados na literatura são *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacea*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Serratia* e *Enterobacter* (BRASIL, 2007).

Dentre os micro-organismos, as bactérias do gênero *Staphylococcus* são reconhecidas como um dos maiores patógenos responsáveis por uma ampla incidência de infecções, desde moderadas infecções de pele até as mais agressivas bacteremias e septicemias (KIM et al., 2014). Além disso, as leveduras do gênero *Candida* colonizam a flora microbiana da cavidade bucal, da pele, do trato gastrointestinal e urogenital de indivíduos saudáveis (HUBE & NAGLIK, 2001), mas podem agir como patogênicas em determinadas condições, como é o caso de indivíduos imuno deprimidos.

Acredita-se que o efeito antimicrobiano de fontes naturais deve-se a presença de compostos bioativos, principalmente aos compostos fenólicos (MAIER et al., 2009), visto que o mecanismo de ação de certos compostos fenólicos ocorre sobre diferentes estruturas celulares, atuando principalmente na ruptura da membrana celular (SIERRA-ALVAREZ; LETTINGA, 1991).

No geral, a atividade antimicrobiana é estudada, avaliada e confirmada utilizando-se testes de sensibilidade *in vitro* pelas técnicas de difusão em meio sólido e diluição em meios de cultura líquidos, a partir dos quais são avaliados os efeitos bacteriostáticos/bactericidas, fungistáticos/fungicidas dos produtos avaliados. A partir destes ensaios, pode-se determinar a menor concentração da droga ou produto vegetal capaz de inibir o crescimento do microorganismo, valor este conhecido por Concentração Inibitória Mínima.

A atividade antimicrobiana depende do método de extração empregado, da quantidade de compostos disponível da planta e solvente utilizado, sendo o extrato etanólico e metanólico mais eficiente quando comparado ao hexânico (RABELO et al., 2014).

De acordo com a literatura, a investigação de espécies do gênero *Annona*, em relação à atividade antimicrobiana, foi realizada e verificou-se que os extratos dos talos e das folhas da atemóia mostraram-se ativos contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*. No entanto, foram resistentes as cepas de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Serratia marcescens* e *Shigella flexneri*, sendo a primeira Gram-positiva, e as demais, Gram-negativas (RABÊLO et al., 2014). A membrana plasmática de bactérias Gram-negativas possui um sistema de bicamadas lipídicas, o que dificultaria a penetração de substâncias antimicrobianas, conferindo-lhes um maior grau de resistência (SCHVED et al., 1994).

Chandrashekar e Kulkarni (2011) observaram atividade do extrato das folhas da fruta do conde sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella aureus* e *Salmonella typhi*, sem observar atividade sobre fungos do gênero *Aspergillus*. Aher

et al. (2012) avaliaram o potencial antimicrobiano de extratos das sementes de *Annona squamosa*, constatando que a fração metanólica apresentou maior atividade antimicrobiana contra cepas de *B. subtilis*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. No entanto, para a Atemóia, especificamente casca, polpa e semente, não foi observado nenhum estudo da literatura científica, até o momento, o que justifica a investigação de seus extratos contra alguns micro-organismos selecionados.

9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ANGELO, M. A.; JORGE, N. Phenolic compounds in foods – a brief review. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 66, 2007.

Disponível em <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552007000100001&lng=pt&nrm=iso>. acesso em 06 jun. 2016.

AHER, P. S.; SHINDE, Y. S.; CHAVAN, P. P. *In vitro* evaluation of antibacterial potential of *Annona squamosa* L. against pathogenic bacteria. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, Chandigarh, v. 3, p. 1.457-1.460, 2012.

AHMAD, N.; ZUO, Y.; LU, X.; ANWAR, F.; HAMEED, S. Characterization of free and conjugated phenolic compounds in fruits of selected wild plants. **Food Chemistry**, v. 190, p. 80-89, 2016.

ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; McLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: Recent Progress. **Journal of Natural Products**, v.62, p.504-540, 1999.

ALARCÓN-FLORES, M. I.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; VIDAL, J. L. M.; FRENICH, A. G. Multiclass determination of phytochemicals in vegetables and fruits by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1120-1129, 2013.

ALBUQUERQUE, T. G.; SANTOS, F.; SANCHES-SILVA, A.; OLIVEIRA, M. B.; BENTO, A. C.; COSTA, H. S. Nutritional and phytochemical composition of *Annona cherimola* Mill. fruits and by-products: Potential health benefits. **Food Chemistry**, v. 193, p. 187-195, 2016.

ALMEIDA, J. R. G. S.; OLIVEIRA, M. R.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; RIBEIRO, L. A. A.; LÚCIO, A. S. S. C.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Phenolic quantification and antioxidant activity of *Anaxagorea dolichocarpa* and *Duguetia chrysocarpa* (Annonaceae). **International Journal of Pharma and Bio Science**, v. 2, n. 4, p. 367-374, 2011.

ALMEIDA, M. M. B.; SOUZA, P. H. M.; FONSECA, M. L.; MAGALHAES, C. E. C.; LOPES, M. F. G.; LEMOS, T. L. G. Evaluation of macro and micro-mineral content in tropical fruits cultivated in the northeast of Brazil. **Food Science and Technology**, v. 29, p. 581-586, 2009.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. **Revista Instituto Adolf Lutz**, v.66, p. 1-9. 2007.

APAK, R.; GUCLU, K.; DEMIRATA, B.; OZYUREK, M.; CELIK, S. E.; BEKTASOGLU, B.; BERKER, K. I.; OZYURT, D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the cuprac assay. **Molecules**, v. 12, p. 1496-1547, 2007.

AYALA-ZAVALA, J. F.; VEGA-VEGA, V.; ROSAS-DOMINGUEZ, C.; PALAFOX-CARLOS, H.; VILLA-RODRIGUEZ, J. A. et al. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. **Food Research International**, v. 44, p.1866-1874, 2011.

BADIE, N.; SCHAUSS, A. G. Soursop (*Annona muricata* L.): Composition, Nutritional Value, Medicinal Uses, and Toxicology, in **Bioactive Foods in Promoting Health**, Watson, R. R. and Preedy, V.R., eds. Academic Press, New York, p. 621-643, 2009.

BARRECA, D.; LAGANA, G.; FICARRA, S.; TELLONE, E.; LEUZZI, U.; GALTIERI, A.; BELLOCCO, E. Evaluation of the antioxidant and cytoprotective properties of the exotic fruit *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae). **Food Research International**, v. 44, p. 2302-2310, 2011.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M., DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BASKARAN, R.; PULLENCHERI, D.; SOMASUNDARAM, R. Characterization of free, esterified and bound phenolics in custard apple (*Annona squamosa* L) fruit pulp by UPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v.82, p. 121-127, 2016.

BATAGLION, G.A.; DA SILVA, F.M.A.; EBERLIN, M.N.; KOOLEBN, H.H.F. Simultaneous quantification of phenolic compounds in buriti fruit (*Mauritia flexuosa* L.) by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Food Research International**, v. 66, p. 396-400, 2014

BERMEJO, A. et al. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Product Reports**, v. 22, p. 269-303, 2005.

BERTO, P.; DA SILVA, A.F.; VISENTAINE, J. V.; MATSUSHITA, M.; DE SOUZA, N. E. Proximate compositions, mineral contents and fatty acid compositions of native Amazonian fruits. **Food Research International**, v. 77, p. 441-449, 2015.

BINKOSKI, A. E.; KRIS-ETHERTON, P. M.; WILSON, T. A.; MONTAIN, M. L.; NICOLSI, R. J. Balance of unsaturated fatty acids is important to a cholesterol-lowering diet: comparison of mid-oleic sunflower oil and olive oil on cardiovascular disease risk factors. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 105, p. 1080-1086, 2005.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde**. Brasília, 1 ed., 2004.

CAI, Z.; QU, Z.; LAN, Y.; ZHAO, S.; MA, X.; WAN, Q.; JING, P.; LI, P. Conventional, ultrasound-assisted, and accelerated-solvent extractions of anthocyanins from purple sweet potatoes. **Food Chemistry**, v. 197, p. 266-272, 2016.

CAVÉ, A. et al. Progress in the chemistry of organic natural products. Wien: Springer-Verlag, 1997. 330p.

CHAMPY, P.; GUÉRINEAU, V.; LAPRÉVOTE, O. MALDI-TOF MS Profiling of Annonaceous Acetogenins in *Annona muricata* Products for Human Consumption. **Molecules**, v. 14, p. 5235-5246, 2009.

CHANDRASHEKAR, C.; KULKARNI, V. R. Isolation, characterization and antimicrobial activity of *Annona squamosa* leaf. **Journal of Pharmacy Research**, Melbourne, v. 4, p. 1.831-1.832, 2011.

CHEMAT, F.; VIAN, M. A.; CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products: concept and principles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 8615-8627, 2012.

CHRISTOPHORIDOU, S.; DAIS, P. Detection and quantification of phenolic compounds in olive oil by high resolution ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 633, p. 283-292, 2009.

CLERICI, M. T. P. S.; CARVALHO-SILVA, L. B. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. **Food Research International**, v. 44, p. 1658-1670, 2011.

COUTINHO, et al. Use of multivariate statistical techniques to optimize the separation of 17 capsinoids by ultra performance liquid chromatography using different columns. **Talanta**, v. 134, p. 256-263, 2015.

COUVREUR, T. L. P.; PIRIE, M. D.; CHATROU, L. W.; SAUNDERS, R. M. K. et al. Early evolutionary history of the flowering plant family Annonaceae: steady diversification and boreotropical geodispersal. **Journal of Biogeography**, v. 38, p. 664-680, 2011.

DA SILVA, A. C.; JORGE, N. Bioactive compounds of the lipid fractions of agro-industrial waste. **Food Research International**, v. 66, p. 493-500, 2014.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v.15, p.7313-7352, 2010.

DE SOUZA, V. R.; PEREIRA, P. A. P.; QUEIROZ, F.; BORGES, S.V.; CARNEIRO, J. D. S. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, v. 134, p. 381-386, 2012.

DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J. P.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G.; CROZIER, A. Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, p. 1818-1892, 2013.

DONADIO, L. C. Situação atual e perspectivas das anonáceas. In: SÃO JOSÉ, A. R.; SOUZA, I. V. B., MORAIS, O. M.; REBOUÇAS, T. N. H (Ed.). **Anonáceas: produção e mercado** (pinha, graviola, atemóia e cherimóia). Bahia: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, p. 1-4, 1997.

DUNFORD, N. T. Health benefits and processing of lipid based nutritionals. **Food Technology**, v. 55, p. 38-44, 2001.

FADAVI, A.; BARZEGAR, M.; AZIZI, M. H. Determination of fatty acids and total lipid content in oilseed of 25 pomegranates varieties grown in Iran. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 676-680, 2006.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; da SILVA, E. G. P.; DOS SANTOS, W. N. L. et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 2-14, 2007.

GARCIA-SALAS, P.; VERARDO, V.; GORI, A.; CABONI, M. F.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNADEZ-GUTIÉRREZ, A. Determination of lipid composition of the two principal cherimoya cultivars grown in Andalusian Region. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p.390-397, 2016.

GONZÁLEZ-ZORN, B.; ESCUDERO, J. A. Ecology of antimicrobial resistance: humans, animals, food and environment. **International Microbiology**, v. 15, p. 101-109, 2012.

GORISNTEIN, S.; ZACHWIEJA, Z.; FOLTA, M.; BARTON, H.; PIOTROWCICZ, J.; ZEMSER, M. et al. Comparative contents of dietary fiber, total phenolics, and mineral in persimmons and apples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 952-957, 2001.

GUINAZI, M. Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. **Química Nova**, v. 32, p. 2098-2103, 2009.

GU, Z. M.; ZENG, L.; WU, J. Screening for Annonaceous Acetogenins in Bioactive Plant extracts by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 242-248, 1997.

GUPTA-ELERA, G.; GARRETT, A. R.; MARTINEZ, A.; ROBISON, R. A.; O'NEIL, K. L. The antioxidant properties of the cherimoya (*Annona cherimola*) fruit. **Food Research International**, v. 44, p. 2205-2209, 2011.

GUTIERREZ, M.; SOLA, M. M.; PASCUAL, L.; RODRIGUEZ-GARCIA, M. I.; VARGAS, A. M. Ultrastructural changes in Cherimoya fruit injured by chilling. **Food structure**, v. 11, p. 323-332, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; Free radicals in biology and medicine, 3rd ed. **Oxford University Press Oxford**. 1999.

HAMINIUK, C. W. I. MACIEL, G. M.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; PERALTA, R. M. Phenolic compounds in fruits - an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 10, p. 2023-2044, 2012.

HANDA, C. L.; De LIMA, F. S.; GUELFY, M. F.G. et al. Multi-response optimisation of the extraction solvent system for phenolics and antioxidant activities from fermented soy flour using a simplex-centroid design. **Food Chemistry**, v. 197, p. 175-184, 2016.

HARDISSON, A. RUBIO, C.; BAEZ, A.; MARTIN, M.; ALVAREZ, R.; DIAZ, E. Mineral composition of the banana (*Musa acuminata*) from the island of Tenerife. **Food Chemistry**, 2001, vol. 73, p. 153-161.

HUBE, B.; NAGLIK J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**, v. 147, p. 1997-2005, 2001.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v.126, p.1821–1835, 2011.

INSTITUTE OF MEDICINE, Dietary reference intakes: The essential guide to nutrient requirements. **The National Academy Press**, Washington, D.C. (2006).

JAKOBEK, L.; BOC, M.; BARRON, A. R. Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Apples. **Food Analytical Methods**, v. 8, p. 2612-2625, 2015.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, p. 2328-2375, 2013.

KIM, K. J.; YUN, H. H.; JEONG, S. I.; CHA, J. D.; KIM, S. M.; YOU, Y. O. Inhibitory effects of *Caesalpinia sappan* on growth and invasion of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 81-87, 2004.

LANDETE, J. M. Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n. 10, p. 936–948, 2012.

LANGSETH, L. **Antioxidants and their effects on health**. In: SCHMIDL, M. K., LABUZA, T. P. Essential of foods. Maryland: Aspen Publication, p. 303-317, 2000.

LANNUZEL, A.; RUBERG, M.; MICHEL, P. P. Atypical Parkinsonism in the Caribbean Island of Guadeloupe: Etiological Role of the Mitochondrial Complex I Inhibitor Annonacin. **Movement Disorders**, v. 23 (15), p. 2122-2128, 2008.

LEMOS, E. E. P. A produção de anonáceas no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 77-85, 2014.

LIMA, L. A. R. S.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 122, p. 1.129-1.138, 2010.

LIU, W., KONG, Y., ZU, Y. et al. Determination and quantification of active phenolic compounds in pigeon pea leaves and its medicinal product using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 4723-4731, 2010.

LIU, T. T.; CHAO, L. K.P.; PENG, C. W. et al. Effects of processing methods on composition and functionality of volatile components isolated from immature fruits of atemoya. **Food Chemistry**, v, 202, p. 176-183, 2016.

LIU, K. D.; LI, H. L.; YUAN, C. C.; HUANG, Y. L. ; CHEN, Y. ; LIU, J. X. Identification of phenological growth stages of sugar apple (*Annona squamosa* L.) using the extended BBCH-scale. **Scientia Horticulturae**, v. 181, p. 76–80, 2015.

LOIZZO, M. R.; TUNDIS, R.; BONESI, M.; MENICHINI, F.; MASTELLONE, V.; AVALLONE, L.; MENICHINI, F. Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of *Annona cherimola* Mill. (cherimoya) peel and pulp in relation to their total phenolic and total flavonoid contents. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 25, p. 179-184, 2012.

LOPES, A.; RICO, M.; RIVERO, A.; TANGIL, M. S. The effect of solvents of the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. **Food chemistry**, v. 125, p. 1104-1109, 2011.

MACHLIN, L. J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB Journal**, Bethesda, v.1, n.6, p.441-445, 1987.

MAIER, T.; SCHIEBER, A.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 112, p. 551-559, 2009.

MALACRIDA, C. R. Caracterização de oleos extraídos de sementes de frutas: composição de ácidos graxos , tocoferois e carotenoides. 2009. 105 fls. **Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos)**. Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’, São José do Rio Preto/SP; 2009.

MARCELLINI, P. S.; CORDEIRO, C. E.; FARAONI, A. S.; BATISTA, R. A.; RAMOS, A. L. D.; LIMA, A. A. Comparação físico-química e sensorial da atemóia com a pinha e a graviola produzidas e comercializadas no estado de Sergipe. **Alimentos e Nutrição**, v. 14, p. 187-187, 2003.

MASSON, L.; CAMILO, C., GONZALEZ, K.; CACERES, A.; JORGE, N.; TORIJA, E. N. New sources of oilseeds from Latin American native fruits. **Natural Product Communications**, v. 3, p. 357-362, 2008.

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

MIR-MARQUÉS, A.; DOMINGO, A.; CERVERA, M. L.; GUARDIA, M. D. Mineral profile of kaki fruits (*Diospyros Kaki* L.). **Food Chemistry**, v. 172, p. 291-297, 2015

MORAIS, D. R.; ROTTA, E. M.; SARGI, S. C. SCHMODT, E. M. et al. Antioxidant activity, phenolics and UPLC–ESI(–)–MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. **Food Research Internacional**. v.77, p.392-399, 2015.

MOSCA, J. L.; CAVALCANTE, C. E. B.; DANTAS, T. M. Características botânicas das principais anonáceas e aspectos fisiológicos de maturação. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. 28 p. (Documentos, 106)

MOTILVA, M. J.; SERRA, A.; MARCIÀ, A. Analysis of Food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: an overview. **Journal of Chromatography A**, v. p. 66-82, 2013.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NUNEZ, M. J.; PARAJO, J. C.; Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**. v.72, p.145-171, 2001.

NUUTILA, A. A. M.; KAMMIOVIRTA, K.; OKSMAN-CALDENTEY, K. M. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. **Food Chemistry**, v. 76, p. 519-525, 2002.

PARNIAKOV, O.; BARBA, F.; GRIMI, N.; LBOVKA, N.; VOROBIEV, E. Extraction assisted by pulsed electric energy as a potential tool for green and sustainable recovery of nutritionally valuable compounds from mango peels. **Food chemistry**, v. 192, p. 842, 848, 2016.

PAZ, M.; GÚLLON P.; BARROSO, M. F.; CARVALHO, A. P.; DOMINGUES, V. F.; GOMES, A. M.; BECKER, H.; LONGHINOTTI, E.; DELERUE-MATOS, C. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: evaluation of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 172, p. 462-468, 2015.

PESCHEL, W.; SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W.; PLESCHER, A.; GARTZÍA, I.; JIMÉNEZ, D. *et al.* An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, v. 97, p. 137-150, 2006.

PINO, J. A. (2010). *Annona Fruits Handbook of Fruit and Vegetable Flavors* (pp. 229-246): John Wiley & Sons, Inc.

PINTO, A. C. Q.; CORDIERO, M. C. R.; ANDRADE, S. R. M. *et al.* **Annona species**. Southampton: University of Southampton, International Centre for Underutilised Crops, 2005.284p.

POTTS, L. F. *et al.* Annonacin in *Asimina triloba* fruit: Implication for neurotoxicity **Neurotoxicology**. v. 1, p. 53-58, 2012.

RABELO, S. V.; DA COSTA, M. M.; LIBÓRIO, R. C.; ALMEIDA, J. R. G. S. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de atemóia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 265-271, 2014.

RADWAN, M. A.; SALAMA, A. K. Market basket survey for some heavy metals in Egyptian fruits and vegetables. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 1273-1278, 2006
RANA, S. V. Fatty Oil and Fatty Acid Composition of *Annona squamosa* Linn. Seed Kernels. **International Journal of Fruit Science**, v. 15, p. 79-84, 2015.

REZAIRE, A.; ROBINSON, J. C.; BERAU, D.; VERBAERE, A.; SOMMERER, N., KHAN, M. K.; DURAND, P.; PROST, E.; FILS-LYCAON, B. Amazonian palm *Oenocarpus bataua* (“patawa”): chemical and biological antioxidant activity – phytochemical composition. **Food Chemistry**, 149, 62-70, 2014.

RICHRADS, K. M.; TRAN, K.; LEVINE, R. A. LUO, R.; et al. Improved Extraction of Soluble Solids from Some Brazilian and North American Fruits. **The Natural Products Journal**, v. 4, p. 201-210, 2014.

RICHTER, B. E.; JONES, B. A.; EZZELL, J. L.; PORTER, N. L. Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 1033-1039, 1996.

RODRIGUEZ-SOLANA, R.; SALGADO, J. M.; DOMINGUEZ, J. M.; CORTES-DIEGUEZ, S. Comparison of soxhlet, accelerated solvent and supercritical fluid extraction techniques for volatile (GC-MS and GC/FID) and phenolic compounds (HPLC-ESI/MS/MS) from lamiaceae species. **Phytochemical Analysis**, v. 26, p. 61-71, 2015.

ROESLER. R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; PASTORE, G. Evaluation of the antioxidant properties of the Brazilian Cerrado fruit *Annona crassiflora* (Araticum). **Journal of Food Science**. v.71, p.102-107, 2006.

SANTOS, D. Y. A.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids on *Annona* from Brazil taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 55, p. 567-573, 2000.

SCHVED, F.; HENIS, Y.; JUVEN, B. J. Response of spheroplasts and chelator-permeabilized cells of gram-negative bacteria to the action of the bacteriocins pediocin SJ-1 and nisin. **International journal and food microbiology**, Amsterdam, v. 21, n. 4, p. 305-314, 1994.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

SIERRA-ALVAREZ, R.; LETTINGA, G. The effect of aromatic structure on the inhibition of acetoclastic methanogenesis in granular sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 34, n. 4, p. 544-550, 1991.

SILVEIRA et al., Phenolic compounds from yerba mate based beverages – A multivariate optimization. **Food chemistry**, v. 190, p. 1159-1167.2016.

SPINOLA, V.; PINTO, J.; CASTILHO, P. C. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD-ESI-MSn and screening for their antioxidant activity. **Food chemistry**, v. 173, p. 14-30, 2015.

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

SZYMANKA, R.; KRUK, J. Tocopherol content and isomers' composition in selected plant species. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 29-33, 2008.

TACO. **Tabela Brasileira de composição de alimentos**. Campinas, Nepa-Unicamp (2011) (Versão 4).

TANG, K.S. C.; KONCZAK, I.; ZHAO, J. Identification and quantification of phenolics in Australian native mint (*Mentha australis* R. Br.). **Food chemistry**, v. 192, p. 698-705, 2016.

TORRES, L. M. A. R.; SILVA, M. D.; GUAGLIANONI, D. G. et al. Effects of heat treatment and calcium on postharvest storage of atemoya fruits. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, p.359-368, 2009.

VASCO, C. RUALES, J. KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v. 111, p. 816-823, 2008.

VILLAVERDE, J. J.; OLIVEIRA, L.; VILELA, C.; DOMINGUES, R. M.; FREITAS, N. et al. High valuable compounds from the unripe peel of several *Musa* species cultivated in Madeira Island (Portugal). **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 507-512, 2013.

CAPÍTULO II

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO, DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA ATEMÓIA

OPTIMIZATION OF EXTRACTION, DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ATEMOYA

Maria Rosa de Moraes¹, Janclei Pereira Coutinho¹, Marta Cristina Teixeira Duarte², José Teixeira Filho³, Robert E. Smith⁴, Helena Teixeira Godoy¹

¹ *Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Rua Monteiro Lobato, 80, Laboratório de Análise de Alimentos – DCA/FEA. Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-862, Campinas/SP, Brasil.*

² *Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, (UNICAMP), Rua Alexandre Cazelatto, 999, 13148-218, Paulínia/SP, Brasil.*

³ *Faculdade de Engenharia Agrícola (UNICAMP), Av. Candido Rondon, 501, 13083-875, Campinas/SP, Brasil*

⁴ *Food and Drug administration (FDA) 11510 W 80th St, Lenexa, KS, 66214, USA.*

RESUMO

Um planejamento de mistura centróide simplex incluindo três solventes (água, etanol e metanol) foi usado para otimizar a extração dos compostos fenólicos da polpa de atemóia e seus sub-produtos (casca e semente). A melhor condição de extração para a casca e polpa foi definida como uma mistura de etanol e água (70:30, v/v), enquanto que para a semente foi metanol e etanol (50:50, v/v). A capacidade antioxidante dos extratos da casca, polpa e semente da atemóia foi avaliada utilizando os métodos ORAC e ABTS e a atividade antimicrobiana foi testada contra os patógenos alimentares mais frequentemente encontrados. Os resultados mostraram associação significativa entre o potencial antioxidante e teor de fenólicos totais. O extrato da casca de atemóia apresentou teor de fenólicos totais variando entre as safras de 73 a 111 mg EAG/g peso seco (p.s) e elevada capacidade antioxidante, além de apresentar um eficiente controle do *Bacillus cereus* e inibir o crescimento da *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A polpa de atemóia apresentou teor médio de fenólicos totais de 22 mg EAG/g p.s, inibição do *B. cereus* e *E. coli*. Na semente foi encontrado teor de 3,9 mg EAG/g p.s, mas esta não apresentou qualquer atividade antimicrobiana. Esses resultados destacam as propriedades antioxidantes e antimicrobianas da atemóia, especialmente da casca, e incentivam o aproveitamento dos sub-produtos da fruta na aplicação de indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas.

Palavras chave: otimização multivariada, capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

A simplex centroid design using three solvent mixtures (water, ethanol and methanol) was used to optimize the extraction of phenolic compounds from atemoya (*Annona cherimola* Mill x *A. squamosa* L.) fruit pulp, peels and seeds by ultrasonication. The best mixture for the fruit pulp and peels was ethanol and water (70:30, v/v). The best mixture for extracting the seeds was methanol and ethanol (50:50, v/v). The antioxidant capacities of the extracts were evaluated by the ORAC and ABTS methods. Also, the antimicrobial activities against the most frequently encountered food pathogens were tested. The results showed that there was a significant association between the antioxidant potential and the concentrations of total phenolics. The peel extract had concentrations of total phenolics that ranged from 73 to 111 mg gallic acid equivalents per gram dry weight (mg GAE/g_{dw}), depending on the harvest season, and an elevated antioxidant capacity. It also had an antimicrobial activity against *Bacillus cereus* and inhibited the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The fruit pulp had 22 mg GAE/g_{dw} and inhibited the growth of *B. cereus* e *E.coli*. The seeds had 3.9 mg GAE/g_{dw} but had no antimicrobial activities. These results highlight the antioxidant and antimicrobial activities of atemoya, especially the peels. They may also provide an incentive for developing sub-products for applications in the food, cosmetic and pharmaceutical industries.

Keywords: Multivariate optimization, antimicrobial activity, antioxidant capacity

1. INTRODUÇÃO

A atemóia (*Annona cherimola* Mill. x *Annona squamosa* L.) pertencente à família *Annonaceae* é um híbrido interespecífico entre a cherimóia e a fruta do conde (DA CRUZ et al., 2013). As características nutricionais e organolépticas atrativas dos frutos pertencentes a essa família fazem da atemóia uma fruta interessante como fonte de estudos, já que pesquisas relacionadas à sua composição são escassas na literatura. Por ser uma fruta ainda pouco cultivada e desconhecida pela maioria dos consumidores, a atemóia possui poucos dados oficiais de produção (LEMOS, 2014).

Entre os vários grupos de compostos bioativos presentes nessa família, os compostos fenólicos, vitaminas e minerais se destacam devido, principalmente, as suas funções biológicas, incluindo a capacidade antioxidante, antimicrobiana, antimutagênica e antitumoral (VASCO et al., 2008; IGNAT et al., 2011; MORAIS et al., 2015). Estão presentes também as acetogeninas, um dos principais constituintes bioativos encontrados em gêneros específicos da *Annonaceae* (MCLAUGHLIN, et al., 2008; BERMEJO et al., 2005).

A concentração dos compostos bioativos em plantas dependem de muitos fatores como a origem geográfica, aspectos agronômicos, climático e de sazonalidade (DENG et al., 2010; BJORKMAN et al., 2011; TELES et al., 2014). Além disso, a extração desses compostos torna-se uma importante etapa, uma vez que deve resultar em um método de extração seletivo e que possibilite a máxima transferência dos compostos da matriz para o solvente extrator. Com isso, o planejamento estatístico tem sido uma ferramenta muito utilizada para o estudo sistemático do efeito do solvente na extração de compostos bioativos presentes em diversas matrizes alimentícias (PASSARI, et al., 2014; HANDA et al., 2016). O uso desta ferramenta possibilita a redução do tempo e do custo de análise, bem como permite verificar os efeitos de interação entre os fatores estudados, o que não é possível quando se utiliza uma otimização univariada (COUTINHO, et al., 2015; SILVEIRA et al., 2016).

A fim de obter uma extração completa e as maiores concentrações de compostos desejados, o solvente ideal deve apresentar compatibilidade com as propriedades dos materiais extraídos, maior capacidade de extração em termos dos seus coeficientes de substâncias saturadas no solvente, além de apresentar também seletividade (KIM & VERPOORTE, 2010). Embora o rendimento máximo de extração de compostos fenólicos seja necessário para satisfazer as exigências das indústrias alimentícias e farmacêuticas, os riscos ambientais e os relacionados à saúde também devem ser considerados ao selecionar um solvente de extração. Neste contexto, os solventes de extração “verdes”, tais como água e

etanol ganham mais importância que outros solventes “não verdes” como o metanol, acetona e acetonitrila (CHEMAT et al., 2012; HANDA et al., 2016).

De maneira geral, as frutas são comercializadas *in natura*, na forma de sucos, geleias, compotas e purês. No entanto, durante o processamento, uma grande quantidade de resíduos de alimentos e subprodutos são gerados, podendo causar poluição ambiental se não forem devidamente tratados (PARNIAKOV et al., 2016). Em face dessa realidade, nos últimos anos, a indústria alimentícia e farmacêutica têm buscado soluções para reutilizar estes resíduos, de forma a aproveitar os nutrientes e os compostos bioativos presentes nos mesmos (PESCHEL et al., 2006; GORINSTEIN et al., 2011). Portanto, o estudo da composição das frações menos aproveitadas da fruta, como a casca e a semente, constitui um passo importante para avaliar o seu potencial de fornecer compostos benéficos à saúde.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi utilizar um planejamento de misturas centróide simplex para determinar o solvente, ou a mistura de solventes (etanol, metanol, água) que resultasse na máxima extração dos compostos fenólicos totais da casca, polpa e semente de atemóia. Os extratos obtidos a partir da combinação otimizada de solventes foram submetidos às análises de compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante e antimicrobiana para as diferentes partes da atemóia provenientes de duas diferentes safras.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostra

Amostras dos frutos de atemóia - cultivar Thompson, safras de 2012 (colhidos em setembro) e 2013 (colhidos em Junho) foram obtidos no município de Pilar do Sul/SP e enviadas para o Laboratório de Análises da Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP. Cerca de 50 frutos de cada safra foram selecionados no estádio de maturação comercial (polpa macia e casca ligeiramente verde-amarelada) e higienizados com hipoclorito de sódio a 200 ppm por 20 min. Após esta etapa, foram despulpados em despulpadeira de escova para facilitar a separação da casca, polpa e semente, que em seguida foram congelados e liofilizados. Posteriormente ao processo de liofilização, a casca, polpa e semente foram moídas, embaladas a vácuo e congeladas (-18 °C) até o momento da análise.

2.2 Equipamentos

Para a determinação da capacidade antioxidante e compostos fenólicos totais foi utilizada uma leitora de microplacas da marca BMG Latch® , modelo Fluostar Omeg. Um liofilizador da marca Terrone ® , modelo LS3000, foi utilizado para desidratar as amostras. Ultrassom da marca Microsonic SX-20, Arruda Ultra-sons LTDA, Brasil. Moinho analítico da marca IKA®, modelo A-11, evaporador rotativo a vácuo (marca Fisatom), Espectrofotômetro UV-Mini 1240, Shimadzu; capela de fluxo laminar Germfree, Laboratories Inc., estufas de incubação, autoclave.

2.3 Procedimento de Extração

A extração das amostras foi feita de acordo com o método descrito por Kähkönen et al. (1999), com algumas modificações. Em um tubo Falcon de 50 mL, pesou-se 1g do material liofilizado e posteriormente, uma alíquota de 20 mL de solvente foi adicionada e os tubos agitados cuidadosamente. Os tubos foram sonicados em ultrassom por 15 min e centrifugados a 4200 rpm por 15 min à 4 °C. O sobrenadante foi coletado e o precipitado extraído mais duas vezes com 5 mL de solvente nas condições previamente descritas. Os sobrenadantes coletados foram combinados e filtrados em papel tipo Watman nº1.

2.4 Planejamento de mistura

Para otimização do solvente de extração, um planejamento de mistura centróide simplex, utilizando água, metanol e etanol, e a mistura destes, foi proposto, com o intuito de se verificar efeitos de interação que resultassem um aumento no teor de compostos fenólicos totais. O procedimento da extração foi descrito de acordo com o item 2.3. Esses solventes foram selecionados na tentativa de se encontrar uma mistura com a participação de solventes de menor toxicidade e por apresentarem alta afinidade por moléculas contendo grupos hidroxil (PESCHEL et al., 2006; LOPES et al., 2011; HANDA et al., 2016).

2.5 Quantificação de compostos fenólicos totais

A quantificação de compostos fenólicos totais foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999). Para as análises, uma alíquota de 25 µL do extrato foi transferida para o poço da microplaca e adicionou-se 125 µL do reagente Folin-Ciocalteu, previamente diluído em água destilada (1:10). A mistura

permaneceu em repouso por 5 min. Em seguida, adicionou-se 100 μL de carbonato de sódio 4%. Essa mistura foi mantida em temperatura ambiente, ao abrigo da luz por um período de 2 h. A absorbância foi medida na leitora de microplacas em um comprimento de onda de 740 nm. Foi construída uma curva analítica, usando como padrão de comparação o ácido gálico com seis pontos equidistantes, todos em triplicata e com concentração variando de 5 a 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A regressão linear dessa curva foi submetida à análise de variância (ANOVA $p < 0.05$) e os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico por grama de amostra seca (mg EAG/g_{p.s.}).

2.6 Capacidade antioxidante

2.6.1 Ensaios de ABTS (2,2-azino-bis(3-etilbenzotriazolina-6-ácido sulfônico))

A capacidade antioxidante pelo método ABTS foi determinada conforme metodologia descrita por Rufino et al. (2010). O radical $\text{ABTS}^{\circ+}$ foi formado pela reação de 7 mM de ABTS com 140 mM de persulfato de potássio, armazenado ao abrigo da luz à temperatura ambiente, por 16 h. Uma vez formado, o radical foi diluído com etanol até a obtenção da absorbância de $0,700 \pm 0,05$ em um comprimento de onda de 734 nm. Uma alíquota de 2,5 μL do extrato foi transferida para os poços da microplaca e uma solução com 250 μL do radical $\text{ABTS}^{\circ+}$ foi adicionado em seguida.

O resultado foi avaliado após 6 min de reação. Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) foi utilizado como antioxidante padrão para a elaboração da curva analítica, nas concentrações de 60 a 900 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com 6 pontos equidistantes em triplicata, e sua regressão foi submetida à ANOVA ($p < 0,05$).

2.6.2 Ensaios de ORAC – Oxygen Radical Absorbance Capacity

Este método é baseado na capacidade de fluorescência da fluoresceína na presença de radicais de oxigênio, sendo realizado segundo metodologia proposta por Dávalos et al. (2004). Primeiramente, preparou-se uma solução de tampão fosfato 75 mmol L^{-1} (pH 7,4) que foi utilizada para solubilizar a fluoresceína e o AAPH (2,2-azobis(2-metilpropianamida)dicloridrato). Para a análise, uma mistura de 20 μL de extrato, 120 μL de fluoresceína sódica e 60 μL de solução de AAPH foram adicionadas à microplaca e incubadas a 37 °C. A leitura foi realizada a 520 nm de emissão e 485 nm de excitação, através do decaimento da emissão de fluorescência em função do tempo até a estabilização. Foi

construída uma curva analítica com o padrão de referência Trolox, com 6 pontos equidistantes, todos em triplicata e concentração variando de 60 a 850 $\mu\text{mol}_{\text{trolox}} \text{L}^{-1}$.

2.7 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

2.7.1 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados no ensaio de atividade antimicrobiana foram: *Bacillus cereus* CCT 2576, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Pseudomonas aeruginosa* 13388 e *Candida albicans* CCT 0776, da Divisão de Microbiologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA – Unicamp).

2.7.2 Atividade antimicrobiana pelo teste de microdiluição

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados pelo método da microdiluição, de acordo com CLSI (2002, 2005), determinando-se a concentração mínima inibitória (MIC).

Em uma microplaca estéril de 96 orifícios ou poços (8 linhas A-H/1-12 colunas) foram depositados 100 μL de caldo RPMI-1640. Na primeira coluna foram depositados 50 μL do extrato diluído (controle de esterilidade das amostras). Na segunda coluna foram depositados 100 μL de cada extrato, sendo o conteúdo dos orifícios homogêneos com o meio e transferidos para os orifícios da coluna seguinte, repetindo-se o procedimento até a coluna 12, sendo os 100 μL finais desprezados. As concentrações avaliadas variaram entre 7,81 e 8000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Posteriormente, da coluna 2 a 12 foram adicionados 100 μL do inóculo padronizado (leveduras ou bactérias), sendo as placas seladas com *parafilm*. Como padrão de referência foi utilizado cloranfenicol (bactérias) ou nistatina (*C. albicans*).

2.7.3 Leitura dos Resultados

Bactérias: Após o período de incubação foram adicionados 50 μL da solução de Cloreto de Trifeniltetrazolium - TTC e as placas re-incubadas por 3 h. A MIC foi definida como a menor concentração da amostra capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha, conferida ao meio quando as células apresentam atividade respiratória.

C. albicans: Após o período de incubação foi verificado se houve mudança de coloração do meio RPMI-1640, de rosa (cor original) para amarelo, o que indica mudança de pH ocasionada pelo crescimento microbiano.

2.8 Análise Estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram apresentados como a média e seu desvio padrão. Análise de variância (ANOVA, $p < 0.05$) foi aplicada juntamente com o Teste de Tukey para identificar diferenças significativas entre as médias, usando um software estatístico (Statistica® versão 7.0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Procedimento de Extração

A seleção do solvente desempenha um papel importante na extração dos compostos fenólicos, sendo assim, muitos pesquisadores têm usado frequentemente etanol, metanol, água e suas combinações para a extração de compostos fenólicos (HAYOUNI et al., 2007; LOPES et al., 2011; HANDA et al., 2016). Dessa forma, um planejamento de mistura de solventes foi proposto para avaliar a eficiência da extração dos compostos fenólicos totais na polpa, casca e semente da atemóia (Tabela 1).

Fazendo uma análise preliminar da Tabela 1, é possível observar que o maior teor de compostos fenólicos totais extraídos para a casca de atemóia foi alcançado utilizando etanol/água (experimento 5). Comportamento semelhante foi observado para a polpa da atemóia, onde os maiores teores foram alcançados utilizando mistura binária de solventes (etanol/água, experimento 5) e mistura com partes iguais (ponto central, experimento 7). Já para a semente a mistura de etanol/metanol (experimento 4) foi a que apresentou o melhor rendimento de extração.

Tabela 1: Planejamento de Misturas. Percentual de cada solvente e concentração dos compostos fenólicos totais em diferentes frações da atemóia liofilizada.

Número do Experimento	Variáveis			Concentração (mg EAG/g _{p.s.})		
	Etanol (x ₁)	Metanol (x ₂)	Água (x ₃)	Casca	Polpa	Semente
1	1	0	0	15,61	8,16	1,31
2	0	1	0	81,68	12,82	1,05
3	0	0	1	102,6	10,8	1,32
4	0,5	0,5	0	55,3	10,38	1,69
5	0,5	0	0,5	111,58	15,34	1,14
6	0	0,5	0,5	104,77	15,29	0,90
7	0,33	0,33	0,33	96,4	15,4	1,48
8	0,33	0,33	0,33	91,06	14,22	1,42
9	0,33	0,33	0,33	82,06	14,3	1,47
10	0,66	0,17	0,17	60,3	14,34	1,15
11	0,17	0,66	0,17	102,37	14,8	1,12
12	0,17	0,17	0,66	67,44	13,02	1,40

Para verificar matematicamente tais efeitos, os resultados foram analisados pelo software Statistica testando os modelos linear, quadrático, cúbico especial e cúbico completo para as frações estudadas. Para a validação, cada modelo matemático foi submetido à análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$).

Para a casca da atemóia o modelo cúbico completo foi o que apresentou maior significância ($F_{\text{valor}} > F_{\text{crítico}}$) e não mostrou evidência de falta de ajuste ($F_{\text{valor}} < F_{\text{crítico}}$), conforme demonstra a Tabela 2. Dessa forma, o modelo obtido pode ser utilizado para efetuar previsões dentro da região experimental, a fim de determinar a melhor mistura de solventes e ser utilizado para a construção de superfície de resposta. Duas regiões ótimas foram observadas com maiores concentrações de compostos fenólicos totais, onde predominou as misturas binárias de 70% etanol e 30% água e 80% metanol e 20% água. Nesse sentido, priorizou-se a mistura binária de etanol/água (70: 30, v/v), pois os solventes de extração “verdes” ganham maior importância quando comparado ao metanol, por apresentar menor risco à saúde e gerar menor impacto ambiental (CHEMAT et al., 2012; HANDA et al., 2016).

Nesse ponto ótimo foi prevista uma extração de 133,5 mg EAG/g_{p.s.}, essa condição teórica foi extraída na prática, a qual apresentou uma concentração de 125,90 mg EAG/g_{p.s.} ($\pm 8,78$), que estatisticamente não difere do valor previsto, o que comprova o bom poder de previsão do modelo proposto.

De acordo com a Tabela 2, a regressão quadrática foi significativa ($F_{\text{valor}} > F_{\text{crítico}}$) e não apresentou falta de ajuste ($F_{\text{valor}} < F_{\text{crítico}}$) para a polpa de atemóia, sendo utilizada para efetuar previsões dentro da região experimental estudada. Analisando a superfície de resposta gerada pelo modelo matemático verificou-se que a região ótima abrangeu misturas binárias e ternárias dos solventes, dando preferência a trabalhar com sistemas mais simples. A condição 50% etanol e 50% água (ensaio 5), foi a melhor condição de extração, com teor de CFT de 15,25 mg EAG/g_{p.s.}

Tabela 2: Coeficientes da regressão para o modelo cúbico completo da casca e para o modelo quadrático da polpa de atemóia.

Amostra	Coeficientes da Regressão					ANOVA	
	x_2	x_3	x_1x_3	$x_1x_3(x_1-x_3)$	0	F-valor Regressão (a)	F-valor Falta de ajuste (b)
Casca-CFT (mg GAE.g ⁻¹)	80,58	101,5	205,23	593,7	0	10,55	9,1
Polpa-CFT (mg GAE.g ⁻¹)	x_1	x_2	x_3	x_1x_3	x_2x_3	F-valor Regressão (a)	F-valor Falta de ajuste(b)
	8,64	13,02	10,26	23,16	13,06	8,15	3,82

x_1 =etanol; x_2 =metanol; x_3 =água

Casca: $F_{\text{crítico}}$ 8, 3: 8,85 (a); $F_{\text{crítico}}$ 1,2: 18,51 (b)

Polpa: $F_{\text{crítico}}$ 5,6: 4,39 (a); $F_{\text{crítico}}$ 4,2: 19,25(b)

Ao nível de 95% de confiança

Na tentativa de padronizar o solvente extrator para casca e polpa da atemóia, o modelo foi utilizado para prever o teor de CFT na condição de 70% etanol e 30% água, o qual preveu uma extração de 14,8 mg EAG/g_{p.s.} Foram realizados ensaios de validação para as seguintes proporções: 70:30 (etanol:água, v/v) e 50:50 (etanol:água, v/v). Embora este ensaio já tenha sido realizado no planejamento, este foi novamente repetido na validação. Os valores encontrados foram 15,46 mg EAG/g_{p.s.} (± 0.43) e 15,51 mg EAG/g_{p.s.} (± 0.38), respectivamente, sem diferença estatística entre as misturas. Dessa forma, optou-se por trabalhar com 70% etanol e 30% água.

Para a semente da atemóia os modelos testados apresentaram falta ajuste significativa ($F_{\text{valor}} > F_{\text{crítico}}$), inviabilizando a predição da condição ótima e por isso o solvente extrator selecionado foi o que apresentou o maior valor de compostos fenólicos (Tabela 1, experimento 4) que apresenta uma composição de 50% metanol e 50% etanol.

3.2 Compostos Fenólicos Totais

Os resultados da quantificação de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu estão apresentados na Tabela 3. Notou-se que os extratos da casca apresentaram o maior teor de compostos fenólicos totais (CFT), com valores entre 73 e 111 mg EAG/g_{p.s.}, enquanto que os das sementes apresentaram os menores teores de CFT (em média 3,95 mg EAG/g_{p.s.}). Estes resultados estão de acordo com Morais et al. (2015) que relataram que o teor de compostos funcionais em diferentes tecidos de frutas está localizado preferencialmente na casca e em menor medida na polpa e na semente.

Tabela 3: Teor de compostos fenólicos totais para a polpa, casca e semente de atemóia de diferentes safras.

Amostras	Safra 2012	Safra 2013
	CFT (mg EAG/g _{p.s.})	
Polpa	17,89±2,65 ^B	25,80±1,46 ^A
Casca	73,52±3,13 ^B	111,45±9,27 ^A
Semente	3,90±0,46 ^A	3,99±0,48 ^A

Os resultados foram expressos com a média ± desvio padrão (n=3). EAG = Equivalente de ácido Gálico

*Medias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si a p<0,05 pelo Teste de Tukey.

Em comparação com frutos da mesma família, Da Silva et al. (2014) relataram um teor de CFT de 28,86 mg EAG/g_{p.s.} para polpa de graviola (*Annona muricata*) e Roseler et al. (2007) encontraram 20,3 mg EAG/g_{p.s.} em polpa de araticum. Esses valores são próximos aos níveis verificados neste trabalho. O conteúdo de fenólicos totais na polpa de atemóia foi superior ao verificado em polpas de outras frutas, tais como, abacaxi (9,9 mg EAG/g_{p.s.}), goiaba (17,23 mg EAG/g_{p.s.}), maracujá (7,65 mg EAG/g_{p.s.}), mamão (12,63 mg EAG/g_{p.s.}), manga (6,52 mg EAG/g_{p.s.}), sapoti (2,09 mg EAG/g_{p.s.}) e tamarindo (9,23 mg EAG/g_{p.s.}) (DA SILVA, et al., 2014).

Roesler et al., (2006) verificaram que o teor de CFT na casca da *Annona crassiflora* foi de 111,42 mg EAG/g_{p.s.}, valor similar ao encontrado para a casca de atemóia, já para o extrato aquoso da semente, estes mesmos autores relataram um teor de 16,36 mg EAG/g_{p.s.}, valor superior ao encontrado neste trabalho.

De acordo com Vasco et al. (2008) a polpa das frutas tropicais podem ser classificadas, quanto ao teor de fenólicos totais, em três categorias: baixo (<5 mg EAG/g_{p.s.}), médio (5-25 mg EAG/g_{p.s.}) e alta (> 25 mg EAG/g_{p.s.}). Sendo assim, considerando a média obtida entre as duas safras, a polpa de atemóia apresentou médio teor de CFT.

Condições climáticas influenciam de forma significativa nas características dos frutos, como já foi reportado em outros trabalhos científicos (DENG, et al., 2010; TELES et al., 2014). Em um levantamento das condições climáticas do município de Pilar do Sul/SP, utilizando-se a estação meteorológica de observação de superfície convencional do INMET, foi feita a comparação climática dos anos de 2012 e 2013, de maio a setembro (Tabela 4).

Tabela 4: Valores médios de Insolação diária, temperatura máxima, temperatura mínima, umidade relativa do ar e total de chuva nos meses de maio, junho, julho, agosto e setembro no período de 2002 a 2015 e os anos 2012 e 2013.

Período	Insolação diária (h)	Chuva (mm)	T°C diária máxima	T°C diária mínima	UR (%)
2002 / 2015	6,3	264	25,7	13,7	74
2012	7	364	25,7	14,4	73
2013	6	319	23,3	13,9	75

Pode-se observar que a média de insolação diária no período de 2002/2015 foi de 6,3 horas, valor inferior em 10,6% no ano de 2012 e superior de 5,0% em 2013. O total de chuva médio anual de 2002 a 2015 foi de 264 mm, valor inferior a 40% e 21% aos anos de 2012 e 2013, respectivamente. A temperatura máxima diária média para o ano de 2012 foi igual ao período de 2002/2005 e inferior no ano de 2013. A temperatura mínima diária média para os anos 2012 (4,5%) e 2013 (1,4%) foram superiores ao período 2002/2005. Quanto à umidade relativa do ar a média diária para o ano de 2012 foi ligeiramente inferior (-1,4%) ao período 2002/2005 e para o ano de 2013 foi superior (1,41%). Assim, de maneira geral, o ano de 2012 foi marcado por uma insolação média diária total maior, uma quantidade de chuva maior e temperaturas máximas e mínimas superiores em relação a 2013, mostrando dessa forma condições climáticas diversificadas entre as duas safras o que pode justificar as diferenças significativas observadas entre as safras para a casca e polpa de atemóia.

3.3 Capacidade antioxidante

Vários métodos têm sido desenvolvidos para medir a capacidade antioxidante em materiais biológicos. Muitos pesquisadores utilizam ensaios químicos *in vitro* que apresentam características diferentes (mecanismo, substrato, radical), uma vez que um único método não é capaz de determinar a capacidade antioxidante de todos os grupos de compostos presentes em matrizes complexas (RUFINO et al., 2010; PAZ et al., 2015). Portanto, este estudo

utilizou dois métodos (ABTS e ORAC) para determinar a capacidade antioxidante da casca, polpa e semente de atemóia. Os resultados foram expressos em mmol de equivalente Trolox/g peso seco e estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Capacidade Antioxidante pelo método ORAC e ABTS na polpa, casca e semente da atemóia de diferentes safras, expresso em mmol de equivalente trolox/g_{s.s}

Amostras	ABTS		ORAC	
	ET (mmol Trolox/g p.s)		ET (mmol Trolox/g p.s)	
	2012	2013	2012	2013
Polpa	46,05±6,01 ^A	45,87±7,83 ^A	300,66±21,47 ^B	425,72±26,80 ^A
Casca	277,81±15,71 ^B	314,98±12,03 ^A	2607,65±173 ^B	3021,33±43,63 ^A
Semente	1,57±0,35 ^A	1,81±0,93 ^A	14,29±2,12 ^A	14,37±1,15 ^A

Os resultados foram expressos com a média ± desvio padrão ($n = 3$). ET=Equivalente de Trolox

*Medias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si a $p < 0.05$ pelo Teste de Tukey.

A casca apresentou os maiores valores de capacidade antioxidante ao ser comparada com o restante das amostras, independente do método utilizado. Para essa mesma parte do fruto, as amostras referentes à safra de 2013 se destacaram alcançando os maiores valores, chegando a níveis de 314.98 mmol Trolox/g_{s.s} pelo método de ABTS e 3021.33 mmol Trolox/g_{s.s} pelo método de ORAC. Tais resultados revelam o grande potencial antioxidante que a casca da atemóia possui, mas ainda não é aproveitado pelas indústrias alimentícias. A polpa deteve a segunda maior capacidade antioxidante alcançando valores médios 46 mmol Trolox/g_{s.s} para o método de ABTS e 363 mmol Trolox/g_{s.s} para o método ORAC. Já a semente apresentou a menor capacidade antioxidante, com valores médios de 1,69 mmol Trolox/g_{s.s} (método ABTS) e 14,33 mmol Trolox/g_{s.s} (método ORAC), sem diferença significativa entre as safras.

Observam-se uma correlação direta entre os valores obtidos para fenólicos totais e capacidade antioxidante (0,96 e 0,95 para ORAC e ABTS com CFT). Foi constatada também uma correlação positiva entre os métodos ORAC e ABTS (0,94), existindo uma alta correlação entre esses métodos para diversas matrizes (KAUR, KAAPOR, 2002; ABIDILLE et al., 2005).

3.4 Atividade Antimicrobiana

Os resultados de concentração inibitória mínima (MIC) dos extratos obtidos a partir da polpa, casca e semente da atemóia estão apresentados na Tabela 6. Em geral, os

controles utilizados para avaliar a eficácia dos extratos são antibióticos padrão, tal como indicado para cada micro-organismo.

Tabela 6: Atividade antimicrobiana de extratos de diferentes partes da atemóia das safras de 2012 e 2013.

Microorganismo	Amostras (mg/mL)						Controle
	Saфра 2012			Saфра 2013			
	Polpa	Casca	Semente	Polpa	Casca	Semente	
<i>C. albicans</i>	*	*	*	*	*	*	0,002
<i>S. choleraesuis</i>	*	*	*	*	*	*	0,002
<i>P. aeruginosa</i>	*	*	*	*	*	*	0,062
<i>E. coli</i>	*	1,0	*	8,0	4,0	*	0,004
<i>B. cereus</i>	8,0	2,0	*	2,0	0,5	*	0,004
<i>S. aureus</i>	*	8,0	*	*	*	*	0,007

* MIC > 8,0 mg/mL

Com base nos resultados de inibição, Duarte et al. (2005) propuseram uma classificação para extratos e óleos essenciais de plantas, considerando de inibição elevada os que apresentam MIC até 0,5 mg/mL, de inibição moderada, entre 0,6 e 0,9 mg/mL e de fraca inibição acima de 1,0 mg/mL.

Nesse sentido, os dados da Tabela 6 indicam que a *E. coli* foi inibida com os extratos da casca e da polpa de atemóia (safra 2013), porém, maior atividade foi observada para o extrato da casca da atemóia referente à safra 2012, que apresentou MIC de 1,0 mg/mL contra a bactéria. Esse extrato foi o único ativo contra *S. aureus* (MIC 8,0 mg/mL).

Já o extrato da casca de atemóia (safra de 2013) apresentou atividade elevada no controle do *B. cereus* (MIC 0,5 mg/mL). Para esse mesmo micro-organismo, o extrato da polpa, juntamente com o extrato da casca (safra 2012) apresentaram uma fraca atividade antimicrobiana. A diferença de atividade antimicrobiana entre as safras é influenciada pela variação no teor de constituintes de grupos ativos e pode ser devido às condições climáticas já apresentadas.

Os extratos da casca da atemóia que apresentaram atividade antimicrobiana para *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* estão entre os que apresentaram o maior teor de fenólicos totais, assim como os extratos da semente que não apresentaram qualquer atividade antimicrobiana nas condições estudadas estão entre os extratos de menor concentração de compostos fenólicos, sugerindo correspondência entre a atividade antimicrobiana apresentada e o teor de compostos fenólicos totais.

Pesquisas têm relacionado à atividade antimicrobiana de fontes naturais com a presença de compostos bioativos, principalmente aos compostos fenólicos (MAIER et al., 2009), sendo que o mecanismo de ação dos compostos fenólicos ocorre sobre diferentes estruturas celulares, atuando principalmente na ruptura da membrana celular (SIERRA-ALVAREZ; LETTINGA, 1991).

Nenhum dos extratos estudados inibiu o crescimento da levedura *C. albicans* e das bactérias *S. choleraesuis* e *P. aeruginosa*. A membrana plasmática de bactérias Gram-negativas, como a *S. choleraesuis* e a *P. aeruginosa* possuem um sistema de bicamadas lipídicas, o que dificultaria a penetração de substâncias antimicrobianas, conferindo-lhes um maior grau de resistência (SCHVED et al., 1994). Segundo Stover et al. (2000) a *P. aeruginosa* é uma bactéria altamente versátil e que possui o maior genoma bacteriano sequenciado, resultando assim grande versatilidade e resistência do micro-organismo.

4. CONCLUSÃO

As partes da atemóia, em especial a casca e a polpa, apresentaram atividade biológica *in vitro* (antioxidante e microbiológica), demonstrando assim potencial de aplicação em indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas.

5. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

ABIDILLE, M. D. H.; SINGH, R. P.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JENA, B. S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, Washington, v.90, p.891-896, 2005.

BERMEJO, A.; FIGADERE, B.; ZAFRA-POLO, M. C.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Product Reports**, v. 22, p. 269-303, 2005.

BJÖRKMAN, M.; KLINGEN, I.; BIRCH, A. N.E. et al. Phytochemicals of Brassicaceae in plant protection and human health – influences of climate, environment and agronomic practice. **Phytochemistry**, v. 72, p. 538-556, 2011.

CHEMAT, F.; VIAN, M. A.; CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products: concept and principles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 8615-8627, 2012.

CLSI (2002). Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica – 2ª. edição, M27-A2, Vol. 22 no. 15.

CLSI (2005). Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico - 6ª. edição, M7-A6, Vol. 23, no. 2.

COUTINHO, et al. Use of multivariate statistical techniques to optimize the separation of 17 capsinoids by ultra performance liquid chromatography using different columns. **Talanta**, v. 134, p. 256-263, 2015.

DA SILVA, et al. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 143, p. 398-404, 2014.

DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CÓRDOVES, C.; BARTOLOMÉ, B.; Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC Fluorescein) assay. **Journal Agricultural of Food Chemistry**, v. 52, p. 48-54, 2004.

DENG, S.; WEST, B. J.; JENSEN, J. A quantitative comparison of phytochemical components in global noni fruits and their commercial products. **Food Chemistry**, v. 122, p. 267-270, 2010.

DONADIO, L. C. Situação atual e perspectivas das anonáceas. In: SÃO JOSÉ, A. R.; SOUZA, I. V. B., MORAIS, O. M.; REBOUÇAS, T. N. H (Ed.). **Anonáceas: produção e mercado** (pinha, graviola, atemóia e cherimóia). Bahia: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 1997. p. 1-4.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305–311, 2005.

GORINSTEIN, S.; POOVARODOM, S.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; et al. Antioxidant properties and bioactive constituents of some rare exotic Thai fruits and comparison with conventional fruits. In vitro and in vivo studies. **Food Research International**, v. 44, p. 2222-2232, 2011.

HANDA, C. L.; De LIMA, F. S.; GUELFY, M. F.G. et al. Multi-response optimisation of the extraction solvent system for phenolics and antioxidant activities from fermented soy flour using a simplex-centroid design. **Food Chemistry**, v. 197, p. 175-184, 2016.

HAYOUNI, E. A.; ABEDRABBA, M.; BOUIX, M. HAMDI, M. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1126-1134, 2007.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v.126, p.1821–1835, 2011.

KÄHKÖNEN, M.P.; HOPIA, A.I.; VUORELA, H. J.; RAUHA, J.P.; KALEVI, P.; KUJALA, T.S.; HEINONEN, M. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 10, p. 3954–3962, 1999.

KAUR, C.; KAPOOR, H.C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **Jounal of Food Science Technology**, Oxford, v.37, p.153-161, 2002.

KIM, H. H.; VERPOORTE, R. Sample preparation for plant metabolomics. **Phytochemical Analysis**, v. 21, p. 4-13, 2010.

LEMOS, E. E. P. The production of *annona* fruits in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, p. 77-85, 2014.

LOPES, A.; RICO, M.; RIVERO, A.; TANGIL, M. S. The effect of solvents of the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. **Food chemistry**, v. 125, p. 1104-1109, 2011.

MAIER, T.; SCHIEBER, A.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 112, p. 551-559, 2009.

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

MORAIS, D. R.; ROTTA, E. M.; SARGI, S. C. et al. Antioxidant activity, phenolics and UPLC–ESI(–)–MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. **Food Research Internacional**. v.77, p.392-399, 2015.

PARNIAKOV, O.; BARBA, F.; GRIMI, N.; LBOVKA, N.; VOROBIEV, E. Extraction assisted by pulsed electric energy as a potential tool for green and sustainable recovery of nutritionally valuable compounds from mango peels. **Food chemistry**, v. 192, p. 842, 848, 2016.

PASSARI, L. M. Z. G.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Experimental designs characterizing seasonal variations and solvent effects on the quantities of coumarin and related metabolites from *Mikania laevigata*. **Analytica Chimica Acta**, v. 821, p. 89-96, 2014.

PAZ, M.; GÚLLON P.; BARROSO, M. F.; CARVALHO, A. P.; DOMINGUES, V. F.; GOMES, A. M.; BECKER, H.; LONGHINOTTI, E.; DELERUE-MATOS, C. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: evaluation of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 172, p. 462-468, 2015.

PESCHEL, W.; SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W.; PLESCHER, A.; GARTZÍA, I.; JIMÉNEZ, D. et al. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, v. 97, p. 137-150, 2006.

PINTO, A. C. Q.; CORDIERO, M. C. R.; ANDRADE, S. R. M. et al. **Annona species**. Southampton: University of Southampton, International Centre for Underutilised Crops, 2005.284p.

ROESLER. R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; PASTORE, G. Evaluation of the antioxidant properties of the Brazilian Cerrado fruit *Annona crassiflora* (Araticum). **Journal of Food Science**. v.71, p.102-107, 2006.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive

compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p.996-1002, 2010.

SCHVED, F.; HENIS, Y.; JUVEN, B. J. Response of spheroplasts and chelator-permeabilized cells of gram-negative bacteria to the action of the bacteriocins pediocin SJ-1 and nisin. **International journal and food microbiology**, Amsterdam, v. 21, n. 4, p. 305-314, 1994.

SIERRA-ALVAREZ, R.; LETTINGA, G. The effect of aromatic structure on the inhibition of acetoclastic methanogenesis in granular sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 34, n. 4, p. 544-550, 1991.

SILVEIRA, T. F.; MEINHART, A. D.; SOUZA, T. C.; TEIXEIRA, F. J.; GODOY, H. T. Phenolic compounds from yerba mate based beverages – A multivariate optimization. **Food chemistry**, v. 190, p. 1159-1167.2016.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, **Methods of Enzymology**, New York, v. 299, p. 152-178, 1999.

STOVER, C. V.; PHAM, X. Q.; ERWIN, A. L.; MIZOGUCHI, S. D. et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen, *Nature*, v. 406, p. 959-964, 2000.

TELES, S.; PEREIRA, J. A.; OLIVEIRA, L. M. et al. *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil production, composition, and antioxidant activity under organic and mineral fertilization: Effect of harvest moment. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 217-225, 2014.

VASCO, C.; JENNY, R.; AFAF, K. E. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry** v. 111.4, p.816-823, 2008.

CAPÍTULO III

CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS LIVRES E LIGADOS DA ATEMÓIA POR UPLC-MS/MS

CHARACTERIZATION OF FREE AND CONJUGATED PHENOLIC COMPOUNDS IN ATEMOYA BY UPLC-MS/MS

Maria Rosa de Moraes ¹, Tayse Ferreira da Silveira ¹, Robert E. Smith ²,
Helena Teixeira Godoy ¹.

¹ *Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Rua Monteiro Lobato, 80, Laboratório de Análise de Alimentos – DCA/FEA. Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-862, Campinas/SP, Brasil.*

² *Food and Drug administration (FDA) 11510 W 80th St, Lenexa, KS, 66214, USA.*

RESUMO

A atemóia (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.) é uma fruta exótica com características organolépticas e nutricionais atrativas, porém pouco se sabe sobre os compostos bioativos desse híbrido. O objetivo desse trabalho foi utilizar a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa em tandem (UPLC-ESI(-)-MS/MS) para a caracterização e quantificação dos compostos fenólicos livres e ligados à polpa, casca e semente da atemóia. Entre os quinze compostos analisados pelo método proposto, os extratos da atemóia apresentaram nove compostos fenólicos, dentre livres (catequina, rutina, epicatequina e ácido clorogênico) e obtidos após hidrólise ácida (quercetina, e os ácidos *p*-coumárico, 3,4-dihidroxibenzoico, vanílico e ferúlico). A epicatequina foi o composto majoritário apresentando teor de até 100,3 µg/g_{p.s} na polpa e 730,9 µg/g_{p.s} na casca. Ainda na polpa foi encontrada concentrações consideráveis de catequina e 3,4-dihidroxibenzoico (38,8 e 39,7 µg/g_{p.s}, respectivamente), enquanto que na casca, além desses dois compostos foi quantificado o ácido vanílico. O ácido clorogênico foi detectado na casca, porém abaixo do limite de quantificação da metodologia. As sementes não se apresentaram como fonte desses compostos. De maneira geral, o conteúdo dos compostos fenólicos da casca foi maior quando comparado à polpa e a semente da fruta. Em resumo, os resultados desse trabalho destacam o potencial da atemóia e de seu subproduto, principalmente a casca, como fonte de compostos fenólicos.

Palavras chave: *Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L., espectrometria de massas, hidrólise ácida, subprodutos

ABSTRACT

The *atemoya* fruit (*Annona cherimoya* Mill x *Annona squamosa* L.) has attracted the market interest due to its organoleptic and nutritional characteristics, but little is known about its bioactive compounds composition. The aim of this study was to determine the profile of the free and bounded phenolic compounds in the pulp, seed and peel of the *atemoya*, using ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UPLC-ESI (-) - MS / MS). Nine phenolic compounds were identified in the different parts of the *atemoya*, being 4 in the free form (catechin, rutin, epicatechin and chlorogenic acid), and 6 in the bounded form (quercetin, *p*-coumaric acid, 3,4-dihydroxybenzoic, vanillic and ferulic acid). The epicatechin was the major compound found, with concentrations ranging between 100.3 mg / g_{d.w} for the pulp and 730.9 mg / g_{d.w} for the peel. The pulp had the highest concentration of catechin and 3,4-dihydroxybenzoic acid (38.8 e 39.7 μg/g_{d.w} respectively). Both vanillic and chlorogenic acids were detected only in the peel, however the latter was found below the limit of quantification. No phenolic compounds were detected in the seed extracts. In general, the content of phenolic compounds in the peel was higher when compared to the pulp and the seed. In summary, the results of this work highlighted the potential of *atemoya* and its by-products as sources of phenolic compounds.

Keywords: *Annona cherimoya* Mill x *Annona squamosa* L., mass spectrometry, acid hydrolysis.

1. INTRODUÇÃO

Alguns estudos epidemiológicos demonstraram que o consumo de frutas, pertencentes à família *Annonaceae*, e de seus subprodutos, como sementes, cascas, raízes, caules e folhas, está associado à redução do desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas, por apresentarem substâncias antioxidantes, polifenóis e acetogéninas (MCLAUGHLIN, 2008; JIMÉNEZ et al., 2014). Dentre essas, a atemóia (*Annona cherimola* MILL x *Annona squamosa* L.), híbrido interespecífico entre a cherimóia e a fruta do conde, tem apresentado significativa expansão em áreas cultivadas nos últimos anos e possui características nutricionais e organolépticas atrativas (MARCELLINI et al., 2003; CLERICI & CARVALHO-SILVA, 2011). Porém, até o momento, a literatura científica sobre a composição química e as propriedades bioativas da fruta ainda é escassa.

Os fenólicos, metabólitos secundários sintetizados por plantas, são os principais compostos responsáveis pelas propriedades bioativas relatadas em frutas e vegetais (LIU et al., 2010; IGNAT et al., 2011) e têm recebido grande atenção, devido, principalmente, as suas múltiplas funções biológicas, incluindo atividade antioxidante, antimutagênica e antitumoral. Estudos demonstraram seu potencial na eliminação dos radicais livres, que causam estresse oxidativo e, conseqüentemente, danos a tecidos e biomoléculas do nosso organismo, exercendo assim, importante papel na prevenção de doenças degenerativas, tais como a aterosclerose, disfunção cerebral e câncer (MCLAUGHLIN et al., 2008; IGNAT et al., 2011; DEL RIO et al., 2013). Por estas razões, grande esforço tem sido realizado para caracterizar os compostos fenólicos presentes nos diferentes tecidos vegetais.

Os compostos fenólicos podem ser encontrados na forma livre ou ligada. Esses compostos na forma livre representam a menor fração, na maioria encontra-se na forma de complexos ligados, por meio de ligações éster e glicosídicas, a polímeros da parede celular (carboidratos e proteínas) dos vegetais. Em vista disso, o emprego de processos de hidrólise (ácida, básica ou enzimática), visando à liberação desses fenólicos complexados, tem sido utilizado (NACZK & SHAHIDI, 2004; IGNAT et al., 2011; AHMAD et al., 2016). Dentre esses, a hidrólise sob-refluxo com ácido clorídrico tem sido recomendada, embora as condições em relação ao tempo e temperatura de extração devam ser controlados para evitar a perda dos compostos. (NUUTILA et al., 2002; STALIKAS, 2007).

Técnicas de separação como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS), têm sido amplamente utilizadas para a caracterização e quantificação de compostos com estruturas semelhantes em matrizes

complexas (JIMÉNEZ et al., 2014; BATAGLION et al., 2014). Esse acoplamento oferece a possibilidade de analisar dezenas de metabólitos em pouco tempo, além de apresentar boa resolução e sensibilidade (ALARCÓN-FLORES et al., 2013; MOTILVA et al., 2013; BASKARAN et al., 2016). Como fonte de ionização o uso do electrospray (ESI) no modo negativo mostrou ser mais eficiente e sensível para a caracterização dos ácidos fenólicos e flavonoides (SPINOLA et al., 2015). Além disso, o uso de monitoramento seletivo de reações (SRM) na análise por LC-MS/MS foi considerado uma ferramenta analítica eficiente, por exibir características excelentes, tais como seletividade e especificidade (LIU et al., 2010; BATAGLION et al., 2014).

Durante o processamento de frutas, a casca e a semente são consideradas importantes subprodutos, podendo apresentar maiores teores de compostos bioativos que a parte comestível (MORAIS et al., 2015; GARCIAS-SALAS et al., 2015). Como atualmente estes não são utilizados para fins comerciais, e ainda descartados como lixo, tornam-se uma possível fonte de poluição ambiental (AJILA et al., 2007). Nesse contexto é essencial a investigação da composição dos resíduos da atemóia, pois representam, aproximadamente, 40% do peso total da fruta (CRUZ et al., 2013), para possível utilização em indústrias como fonte de compostos bioativos, objetivando melhorar a sustentabilidade do ciclo.

Com base na falta de conhecimento sobre os compostos bioativos da atemóia e do uso crescente de espectrometria de massas na análise de alimentos, o objetivo do trabalho foi utilizar a cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem utilizando um triplo quadrupolo como analisador no modo SRM para a caracterização e quantificação dos compostos fenólicos livres e ligados à polpa, casca e semente de atemóia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Matéria prima

Os frutos de atemóia, cultivar Thompson, foram obtidos no município de Pilar do Sul/SP, em duas safras (2012 e 2013). Aproximadamente 50 frutos amadurecidos de cada safra foram despulpados em despulpadeira de escova para facilitar a separação da casca, polpa e semente. As diferentes partes foram congeladas e liofilizadas, posteriormente foram moídas, em moinho analítico (IKA[®], modelo A-11/ Staufen, Alemanha), embaladas a vácuo e congeladas até o momento da análise.

2.2. Reagentes

Os padrões de ácido caféico, ácido *p*-coumárico, ácido ferúlico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido gálico, ácido siríngico, ácido sinápico, catequina, epicatequina, rutina, kampferol, quercetina e apigenina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). O padrão do ácido clorogênico foi adquirido da Biopurify phytochemicals Ltd. (Chengdu, China). A seleção desses compostos foi realizada de acordo com estudos prévios e disponibilidade dos padrões no laboratório. Os reagentes empregados no trabalho foram etanol PA (Synth, Brasil), ácido clorídrico PA (Chemco, Brasil), ácido fórmico grau cromatográfico (Merck, Alemanha) e acetonitrila grau cromatográfico (J. T. Baker, USA). A água utilizada nos experimentos foi purificada pelo sistema Direct Q3 UV® (Millipore Corporation, France). Para a análise cromatográfica, todas as soluções foram filtradas em membrana de 0,22 µm (Millipore) e degaseificadas em ultrassom (Microsonic SX-20, Arruda Ultra-sons LTDA, Brasil) previamente à injeção. As soluções estoque dos padrões foram preparadas em etanol, na concentração de 1000 mg.L⁻¹, sendo armazenadas em ultrafreezer (-86 °C), protegidas da luz e previamente filtradas (0,22 µm). Foi construída uma curva analítica com os padrões correspondentes utilizando 7 pontos equidistantes, todos em triplicata e concentração variando de 0.05 a 5.0 µg mL⁻¹.

2.3. Extração

2.3.1. Extração dos fenólicos livres

A extração das amostras foi feita de acordo com o método descrito por Kahkonen et al. (1999), com algumas modificações. Aproximadamente, 1 g da amostra liofilizada foi homogeneizada, em tubos Falcon de 50 mL, com uma alíquota de 20 mL de solvente. Esse solvente foi otimizado (capítulo II) onde definiu-se que para os extratos da casca e polpa da Atemóia o melhor solvente de extração foi uma mistura de etanol e água (70:30, v/v), enquanto que para a semente foi metanol e etanol (50:50, v/v). Posteriormente, os tubos foram sonicados em ultrassom por 15 min e centrifugados a 4000 rpm à 4 °C por 15min. O sobrenadante foi coletado e o precipitado foi extraído mais duas vezes com 5 mL de solvente nas condições previamente descritas. Os sobrenadantes coletados foram misturados e o volume final foi ajustado para 25 mL. Os extratos obtidos foram, posteriormente, filtrados com Milex (Millipore) 0,22 µm e armazenados em ultrafreezer (-82 °C), até o momento da análise.

2.3.2. Extração dos fenólicos conjugados usando hidrólise

A realização da hidrólise dos compostos fenólicos foi realizada de acordo com Nuutila et al. (2002), com algumas modificações, sendo utilizado um sistema de refluxo, composto de um banho de aquecimento com condensadores de bolas. Em um balão de fundo redondo, foram pesados 0,250 g de amostra liofilizada e posteriormente, 5 mL da solução extratora (descrito no item 2.3.1) acidificada com ácido clorídrico a 1,2 M foi adicionada. Os balões foram acoplados ao sistema de refluxo e mantidos a 80 °C por 90 min. Após o processo de extração e hidrólise, o volume final foi ajustado para 25 mL e o pH foi aferido para 3,0 com NaOH, para não danificar a coluna cromatográfica. Os extratos obtidos foram, posteriormente, filtrados com Milex (Millipore) 0,22 µm e armazenados em ultrafreezer (-82 °C), até o momento da análise.

2.4. UPLC-MS/MS

Para a análise dos compostos fenólicos presentes nos extratos da casca, polpa, e semente da atemóia foi utilizado equipamento de cromatografia líquida acoplado a um espectrômetro de massas com analisador triplo quadrupolo, da Waters, modelo Quattro Micro API (Milford, MA, USA). Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna de fase reversa, Phenomenex C₁₈ (Torrance, CA, USA), com 10 cm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno e 1,7 µm de tamanho de partícula. A coluna foi mantida a temperatura constante e igual a 35 °C. A fase móvel empregada consistia em água (Solvente A) e acetonitrila (Solvente B), ambos acidificados com 0.1% (v/v) de ácido fórmico. O gradiente linear, com vazão de 0,3 mL min⁻¹, foi empregado nas seguintes condições: início com 100% A, 9 min 80,3% A, 9,1 min 71,5% A, 12 min 65% A e 13 min 100% A, que foi mantida por 1 min para recondicionar a coluna para as corridas posteriores. O volume de injeção foi de 10 µL usando um injetor automático. Esse método foi adaptado de Souza (2014).

O espectrômetro de massas foi equipado com fonte de ionização por electrospray (ESI), no modo negativo e os parâmetros da fonte de ionização foram: voltagem do capilar, 3,0 KV; temperatura da fonte, 120 °C; taxa do fluxo de gás no cone, 120L/h; taxa do fluxo de gás para a desolvatação, 600L/h e temperatura de desolvatação 400 °C. Nitrogênio (>99% pureza) e argônio (>99,9% pureza) foram os gases usados para a nebulização e colisão dos compostos. Em seguida, as análises foram conduzidas através do monitoramento de reações seletivas (SRM), monitorando duas transições para cada composto padrão, usando dwell time

de 0,05 seg. As configurações foram otimizadas para cada transição e os dados encontram-se na Tabela 1. A aquisição de dados foi realizada com software MassLynx v 4.1.

Tabela 1: Parâmetros da espectrometria de massas otimizados para o SRM

Compostos	TR (min)	Íon precursor ^(a)	Voltagem Cone (V)	Íon Produto ^(b)	Energia Colisão (V)	Íon Produto ^(c)	Energia colisão (V)
Ácido gálico	2,33	169	30	124	15	79	25
Ácido 3,4- dihidroxibenzoico	3.8	153	25	109	15	81	25
Catequina	5,83	289	35	245	15	123	30
Ácido clorogênico	6.03	353	30	191	15	85	45
Ácido vanílico	6.17	167	30	152	15	123	10
Ácido caféico	6.34	179	35	135	15	117	35
Ácido siríngico	6.76	193	30	123	20	124	15
Epicatequina	7.03	289	35	245	15	109	25
Ácido <i>p</i> -coumárico	8.03	163	30	119	15	93	30
Ácido ferúlico	8.88	191	30	134	15	178	10
Ácido sinápico	9.09	223	30	164	15	149	20
Rutina	9.4	609	60	300	40	271	50
Quercetina	11.35	301	45	151	20	179	20
Apigenina	12,47	269	50	117	35	151	25
Kaempferol	12,62	285	48	93	34	187	30

^(a) [M-H]⁻; ^(b) Íon produto usada na quantificação; ^(c) íon produto usado na identificação.

A Tabela 1 apresenta os resultados de tempo de retenção, energia de colisão e os íons produtos usados para a confirmação e quantificação dos compostos. Para cada composto foram selecionados dois fragmentos característicos. O fragmento mais intenso (mais estável) foi escolhido para quantificação, utilizando-se como base uma curva analítica e o segundo fragmento mais intenso para confirmação do mesmo.

2.5. Avaliação do método cromatográfico

O método cromatográfico utilizado para análise de fenólicos foi avaliado de acordo com as recomendações da Agência Brasileira de vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2003). Os parâmetros de validação foram aplicados aos nove compostos fenólicos encontrados em amostras testes, sendo eles: catequina, epicatequina, rutina, quercetina e os ácidos clorogênico, vanílico, *p*-coumárico, ferúlico e 3.4- dihidroxibenzoico. A linearidade do sistema foi verificada para cada um dos compostos através de uma curva de trabalho,

construída com soluções padrões, em sete diferentes pontos, igualmente espaçados entre si, preparados em triplicatas, injetados em ordem aleatória, com a concentração variando de 0.05 a 4.5 ppm. O limite de detecção foi estimado até a obtenção de uma concentração cujo sinal analítico fosse de 3 vezes a relação sinal/ruído e o limite de quantificação 6 vezes a relação sinal/ruído. Para avaliação da repetibilidade do método, foram realizadas 10 injeções consecutivas da solução padrão, as quais incluíam o limite de quantificação, de um ponto intermediário da curva e da extremidade superior da curva. A precisão intermediária do método foi avaliada realizando-se 5 injeções, nos mesmos níveis de concentração utilizados para a repetibilidade, determinadas em 3 dias consecutivos.

2.6. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram apresentados como a média e seu desvio padrão. Análise de variância (ANOVA, $p < 0.05$) foi aplicada juntamente com o Teste de Tukey para identificar diferenças significativas entre as médias, usando um software estatístico (Statistica® versão 7.0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Adaptação do método cromatográfico

Algumas modificações foram realizadas no método proposto por Souza (2014) para a separação do pool de padrões, visando melhorar a seletividade e a resolução dos picos, bem como reduzir o tempo de análise. Nesse contexto, testes univariados, como variação no vazão da fase móvel e gradiente de eluição foram realizados até a obtenção do cromatograma apresentado na Figura 1, que consistiu no gradiente descrito no Item 2.4, com vazão de fase móvel de 0,3 mL/min. Com essas novas condições foi possível reduzir o tempo de corrida de 22 para 13 min, mantendo a seletividade e resolução.

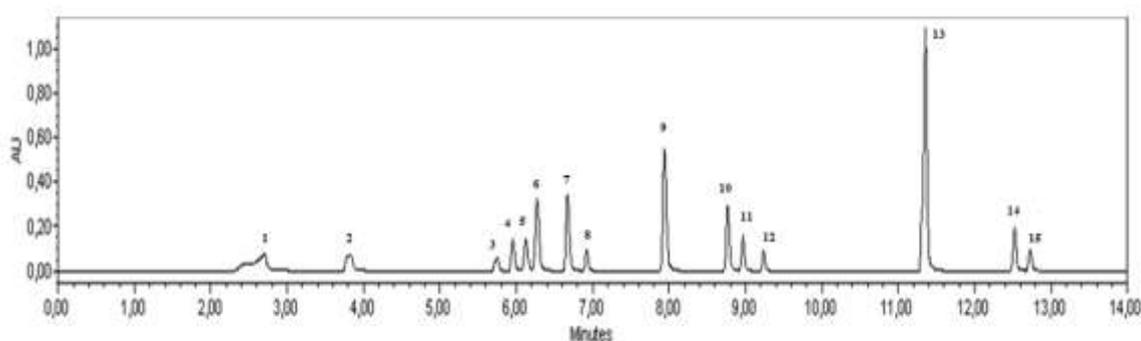


Figura 1: Cromatograma UPLC obtido na separação dos compostos fenólicos. Onde: 1. Ácido gálico, 2. Ácido 3,4-dihidroxibenzoico, 3. Catequina, 4. Ácido clorogênico, 5. Ácido vanílico, 6. Ácido cafeico, 7. Ácido siríngico, 8. Epicatequina, 9. Ácido *p*- coumárico, 10. Ácido ferúlico, 11. Ácido sinápico, 12. Rutina, 13. Quercetina, 14. Apigenina, 15. Kampferol.

3.2 Avaliação do método cromatográfico

Visto que o método sofreu pequenas adaptações, alguns parâmetros foram reavaliados como linearidade, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) (Tabela 2). Todas as curvas de calibração analítica apresentaram coeficiente de determinação $0,991 < R^2 < 0,999$ e a análise de variância (ANOVA) demonstrou que a regressão linear foi significativa para as faixas de concentração estudadas ($p < 0,05$), e que os modelos matemáticos não apresentaram evidência de falta de ajuste ($p > 0,05$). Os LOD variaram de 0,004 a $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que os LOQ variaram 0,01 a $0,257 \mu\text{g mL}^{-1}$. O método mostrou coeficiente de variação, para repetibilidade e precisão intermediária, com valores inferiores a 10% para todos os compostos nos três níveis estudados, podendo assim, ser utilizado para a quantificação dos fenólicos estudados, de acordo com os requisitos estabelecidos pela ANVISA (BRASIL, 2003).

Tabela 2: Parâmetros de validação do método.

Compostos	R ²	Declive	Intercepto	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)	Níveis curva*	Rep. (%; n=10)	Precisão interm. (%; n=3)
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	0,993	847	73,6	0,0085	0,017	1	4,75	3,65
						2	3,91	2,21
						3	3,44	1,89
Catequina	0,991	39,7	2,17	0,128	0,257	1	4,47	520
						2	4,16	3,87
						3	2,34	1,52
Ácido clorogênico	0,995	487	19,95	0,01	0,02	1	3,66	4,30
						2	2,42	2,58
						3	1,23	2,36
Ácido vanílico	0,996	60,7	10,9	0,03	0,06	1	5,29	7,26
						2	4,9	8,25
						3	3,48	1,98
Epicatequina	0,991	54,7	5,614	0,03	0,077	1	8,67	5,87
						2	7,75	4,56
						3	3,7	2,30
Ácido <i>p</i> -coumárico	0,996	1743	32,94	0,007	0,015	1	4,75	3,15
						2	3,37	2,85
						3	1,33	1,62
Ácido ferúlico	0,994	275	2,078	0,01	0,022	1	3,65	3,21
						2	1,63	3,12
						3	0,79	1,11
Rutina	0,999	712	27,2	0,006	0,012	1	4,66	6,40
						2	4,1	8,25
						3	1,6	2,42
Quercetina	0,994	3072	46	0,004	0,01	1	4,72	5,60
						2	2,89	3,84
						3	1,41	2,21

R² = coeficiente de determinação; LOD = limite de detecção; LOQ = limite de quantificação. n=número de ensaios realizados, para o caso da precisão intermediária, n=3, significando 5 injeções realizadas em 3 dias consecutivos.

*Nível 1=0,05 ppm; 2=1,5 ppm; 3=4,5 ppm.

3.3. Determinação dos compostos fenólicos na polpa, casca e semente da atemóia

A Tabela 3 apresenta os resultados da quantificação dos compostos fenólicos livres da polpa, casca e semente da atemóia liofilizada, referentes às safras de 2012 e 2013. Podemos observar que a catequina, epicatequina e rutina foram encontrados na polpa e na casca do fruto, no entanto, o ácido clorogênico foi detectado somente na casca. Na semente a

quantidade de fenólicos determinada foi menor comparada a outras partes do fruto, sendo quantificado apenas a rutina (1,90 $\mu\text{g/g}_{\text{p.s}}$) e detectada a epicatequina.

Tabela 3: Quantificação dos compostos fenólicos livres ($\mu\text{g/g}_{\text{ps}}$) na polpa, casca e semente da atemóia.

Compostos	Polpa 2012	Polpa 2013	Casca 2012	Casca 2013	Semente 2012	Semente 2013
Catequina	24,8 \pm 2,31b	38,8 \pm 2,43a	225,9 \pm 11,27b	324,3 \pm 17,02a	ND	ND
Epicatequina	67,0 \pm 0,60b	100,3 \pm 4,4a	696,1 \pm 14,86b	730,9 \pm 18,27a	D	D
Rutina	1,4 \pm 0,01a	1,3 \pm 0,29a	38,6 \pm 1,23b	65,1 \pm 0,58 ^a	1,6 \pm 0,05b	2,3 \pm 0,02a
Clorogênico *	ND	ND	D	D	ND	ND

Os resultados foram expressos com a média \pm desvio padrão ($n = 3$).

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si a $p < 0.05$ pelo Teste de Tukey.

ND: não detectado; D: detectado; * Ácido clorogênico.

A epicatequina foi o principal flavonoide encontrado na casca (teor médio 713 $\mu\text{g/g}_{\text{ps}}$) e na polpa (84 $\mu\text{g/g}_{\text{ps}}$), seguido da catequina que apresentou 275 $\mu\text{g/g}_{\text{ps}}$ na casca e 31,8 $\mu\text{g/g}_{\text{ps}}$ na polpa da atemóia. Em comparação com a cherimóia, os teores de epicatequina foram em média 242 $\mu\text{g/g}_{\text{ps}}$ para a casca e 131 $\mu\text{g/g}_{\text{ps}}$ para a polpa, enquanto que os níveis de catequina relatados foram 38 e 11,3 $\mu\text{g/g}_{\text{ps}}$ para a casca e polpa, respectivamente (García-Salas et al., 2015). Em comparação com outras frutas, como as bagas de uva e a polpa do buriti, esses também foram os principais flavonoides encontrados (EHRHARDT et al., 2014; BATAGLION et al., 2014). O conteúdo de compostos fenólicos encontrado na casca foi muito maior quando comparado a outras partes do fruto, esse fato também está de acordo com García-Salas, et al. (2015), que analisaram a parte comestível da cherimóia juntamente com seus subprodutos.

No suco da fruta do conde foram encontrados ácidos fenólicos como caféico, ferúlico, *p*-cumárico e o sinápico na forma livre (LEE et al., 2003), os quais não foram observados para o extrato de atemóia na forma livre, sob as condições estudadas. Vários estudos têm demonstrado que os compostos fenólicos livres são dificilmente presentes em alimentos de origem vegetal, mais frequentemente ocorrem como ésteres, glicosídeos e compostos ligados, sendo necessário o uso da hidrólise para a liberação desses compostos (CHEN & ZUO, 2007; ACOSTA-ESTRADA et al., 2014; AHMAD et al., 2016).

A Tabela 4 apresenta a quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos hidrolisados da polpa, casca e semente de atemóia. Os ácidos 3,4-dihidroxibenzoico, vanílico, *p*-coumárico, ferúlico e a quercetina foram os compostos fenólicos encontrados após

a hidrólise ácida nas diferentes partes da fruta, com exceção da semente que não detectou o ácido *p*-coumárico.

Tabela 4: Quantificação dos compostos fenólicos ($\mu\text{g/g}_{\text{ps}}$) em extratos hidrolisados em diferentes partes da atemóia

Compostos	Polpa 2012	Polpa 2013	Casca 2012	Casca 2013	Semente 2012	Semente 2013
Ácido 3.4-dih **	37,5 \pm 0,42b	39,7 \pm 0,47a	44,8 \pm 1,49b	90,2 \pm 1,00a	9,9 \pm 0,27b	11,4 \pm 0,12a
Ácido vanílico	12,9 \pm 0,38b	14,2 \pm 0,40a	32,4 \pm 7,5b	48,1 \pm 0,78 ^a	D	D
* <i>p</i> -coumárico	2,4 \pm 0,24 ^a	2,5 \pm 0,17a	3,2 \pm 0,10b	3,8 \pm 0,25 ^a	ND	ND
Ácido ferúlico	3,2 \pm 0,02b	3,6 \pm 0,53a	10,8 \pm 0,9a	11,0 \pm 0,13 ^a	3,9 \pm 0,13a	3,9 \pm 0,12a
Quercetina	1,50 \pm 0,25b	1,9 \pm 0,18 ^a	2,4 \pm 0,15b	2,7 \pm 0,05 ^a	2,1 \pm 0,05a	2,1 \pm 0,06a

Os resultados foram expressos com a média \pm desvio padrão ($n = 3$).

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si a $p < 0.05$ pelo Teste de Tukey.

ND: não detectado; D: detectado; * Ácido *p*-coumárico; ** Ácido 3.4-dihidroxibenzoico

Os fenólicos mais abundantes presentes no extrato hidrolisado da polpa de atemóia foi o 3,4 dihidroxibenzoico (38,6 $\mu\text{g/g}_{\text{ps}}$) e o ácido vanílico (13,5 $\mu\text{g/g}_{\text{ps}}$) enquanto que o ácido *p*-coumárico (2,45 $\mu\text{g/g}_{\text{ps}}$), ácido ferrúlico (3,41 $\mu\text{g/g}_{\text{ps}}$) e a quercetina (1,74 $\mu\text{g/g}_{\text{ps}}$) estavam presentes em menores quantidades. Ácido gálico, catequinas, epicatequina, ácido protocatecuico, ácido cafeico, ácido *p*-coumárico e ácido sinápico foram identificados tanto na forma livre quanto ligada na polpa da fruta do conde (BASKARAN, et al. 2016).

Em comparação com as diferentes partes do fruto estudadas, a casca foi a que apresentou as maiores concentrações para todos os fenólicos encontrados, onde o ácido 3,4-dihidroxibenzoico e o ácido vanílico apresentaram, em média, 67,5 e 40,3 $\mu\text{g/g}_{\text{p.s}}$ respectivamente.

Possivelmente o uso da hidrólise ácida degradou os compostos fenólicos livres encontrados nesse trabalho (Tabela 3). Esse fato também foi observado por Tarola et al. (2013) em morangos onde ocorreu um decréscimo na concentração da rutina e catequina, enquanto que em *Opuntia ficus indica* a hidrólise ácida causou a degradação dos flavonóides (MOUSSA-AYOUB et al., 2011), porém, tornou possível a liberação dos compostos fenólicos ligados como a quercetina e os ácidos *p*-coumárico, ferúlico, vanílico e o 3,4-dihidroxibenzoico.

Em relação às safras houve diferença significativa nas concentrações dos fenólicos livres e conjugados, independente da parte do fruto estudada, de tal forma que a safra de 2013 foi significativamente maior comparada à safra de 2012, com exceção da rutina livre que não apresentou diferença significativa para a polpa da atemóia. Para os extratos

hidrolisados, o ácido *p*-coumárico da polpa, o ácido ferrúlico da casca e o ácido ferrulico juntamente com a quercetina da semente não difeririam entre si.

4. CONCLUSÃO

No presente trabalho, a composição de compostos fenólicos da polpa, casca e semente da atemóia foi determinada pela primeira vez. Os resultados indicaram que a hidrólise ácida foi eficiente para liberar os compostos fenólicos ligados. Assim, nove compostos fenólicos, dentre os livres (catequina, rutina, epicatequina e ácido clorogênico) e obtidos após hidrólise (quercetina, e os ácidos *p*-coumárico, 3,4-dihidroxibenzoico, clorogênico, vanílico e ferúlico) foram simultaneamente identificados e quantificados por LC-MS/MS. Em comparação com as diferentes partes da fruta estudada, a casca foi a que apresentou as maiores concentrações para todos os fenólicos encontrados. A safra de 2013 influenciou positivamente o teor desses compostos. Assim, o consumo da polpa da atemóia, e a utilização principalmente da casca da fruta pode contribuir de forma significativa como fonte de compostos bioativos para a dieta.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA

ACOSTA-ESTRADA, B. A., GUTIERREZ-URIBE, J. A., SERNA-SALDIVAR, S. O. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, v. 152, p. 46–55, 2014.

AHMAD, N.; ZUO, Y.; LU, X.; ANWAR, F.; HAMEED, S. Characterization of free and conjugated phenolic compounds in fruits of selected wild plants. **Food Chemistry**, v. 190, p. 80-89, 2016.

AJILA, C. M.; NAIDU, K. A.; BHAT, S. G. et al. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. **Food Chemistry**, v. 105, p. 982-988, 2007.

ALARCÓN-FLORES, M. I.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; VIDAL, J. L. M. et al. Multiclass determination of phytochemicals in vegetables and fruits by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1120-1129, 2013.

AL-FARSI, M.; ALASALVAR, C.; MORRIS, A.; BARON, M. et al. Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7592–7599, 2005.

BASKARAN, R.; PULLENCHERI, D.; SOMASUNDARAM, R. Characterization of free, esterified and bound phenolics in custard apple (*Annona squamosa* L) fruit pulp by UPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 82, p. 121-127, 2016.

BATAGLION, G.A.; DA SILVA, F.M.A.; EBERLIN, M.N.; KOOLEBN, H.H.F. Simultaneous quantification of phenolic compounds in buriti fruit (*Mauritia flexuosa* L.) by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Food Research International**, v. 66, p. 396-400, 2014.

BRASIL. Resolução n º899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Disponível em: <WWW.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acessado em 25 de março de 2015.

CHEN, H.; ZUO, Y. Identification of flavonol glycosides in American cranberry fruit. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1357–1364, 2007.

CLERICE, M. T. P. S.; CARVALHO-SILVA, L. B. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. **Food Research International**, v. 44, p.1658-1670, 2011.

CRUZ, L. S.; LIMA, R. Z.; ABREU, C. M. P.; et al. Caracterização física e química das frações do fruto atemóia Gefner. **Ciência Rural**, v. 3, p. 2280-2284, 2013.

DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J. P.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G.; CROZIER, A. Dietary (poly) phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases, **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, p. 1818–1892, 2013.

EHRHARDT, C.; ARAPITSAS, P.; STEFANINI, M.; FLICK, G.; MATTIV, F. Analysis of the phenolic composition of fungus-resistant grape varieties cultivated in Italy and Germany using UHPLC-MS/MS. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 49, p. 860-869, 2014.

GARCIA-SALAS, P.; VERARDO, V.; GORI, A. et al. A. Determination of lipid composition of the two principal cherimoya cultivars grown in Andalusian Region. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p.390-397, 2016.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v.126, p.1821–1835, 2011.

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

KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J. et al. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 3954–3962, 1999

LEE, P. R.; TAN, R. M.; YU. B. et al. Sugars, organic acids and phenolic acids of exotic seasonable tropical fruits. **Nutrition Food Science**, v. 43, p. 267–276, 2003.

LIU, W., KONG, Y., ZU, Y. et al. Determination and quantification of active phenolic compounds in pigeon pea leaves and its medicinal product using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 4723-4731, 2010.

MARCELLINI P. S.; CORDEIRO, C. E.; FARAONI, A. S. et al. Comparação físico-química e sensorial da atemóia com a pinha e a graviola produzidas e comercializadas no estado de Sergipe. **Alimentos e Nutrição**, v. 14, p. 187-189, 2003.

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

MORAIS, D. R.; ROTTA, E. M.; SARGI, S. C. et al. Antioxidant activity, phenolics and UPLC–ESI(–)–MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. **Food Research International**, v. 77, p. 392-399, 2015.

MOTILVA, M. J.; SERRA, A.; MARCIÀ, A. Analysis of Food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: an overview. **Journal of Chromatography A**, v. p. 66-82, 2013.

MOUSSA-AYOUB T. E.; EL-SAMAHY, S. K.; KROH, L.W.; ROHN, S. Identification and quantification of flavonol aglycons in cactus pear (*Opuntia ficus indica*) fruit using a commercial pectinase and cellulase preparation. **Food Chemistry**, v. 124, p.1177-1184, 2011.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

NUUTILA, A. A. M.; KAMMIOVIRTA, K.; OKSMAN-CALDENTEY, K. M. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. **Food Chemistry**, v. 76, p. 519-525, 2002.

SOUZA, T. C. L. **Perfil de compostos fenólicos extraídos de folhas de ora-pro-nóbis (*Pereskia Aculeata* Miller)**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 89 f, 2014.

SPINOLA, V.; PINTO, J.; CASTILHO, P. C. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD-ESI-MSn and screening for their antioxidant activity. **Food chemistry**, v. 173, p. 14-30, 2015.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **J. Sep. Sci.**, v. 30, p. 3268 – 3295, 2007.

TAROLA, A. M.; VELDE, F. V.; SALVAGNI, L.; PRETI, R. Determination os phenolic compounds in strawberries (*Fragaria ananassa* Duch) by high performance liquid chromatography with diode array detection. **Food Analytical Methods**, v. 6, p. 227-237, 2013.

CAPÍTULO IV

COMPOSTOS FENÓLICOS E ELEMENTOS MINERAIS EM FRUTAS *ANNONACEAE*

PHENOLIC COMPOUNDS AND MINERAL ELEMENTS IN *ANNONACEAE* FRUITS

Maria Rosa de Moraes¹, Sean M. Ryan², Helena Teixeira Godoy¹, Andrew L. Thomas³,
Armando O.U. Sabaa-Srur⁴, José Guilherme S. Maia⁵, Kristy M. Richards², Kevin Tran²,
Robert E. Smith²

¹ *Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Rua Monteiro Lobato, 80, Laboratório de Análise de Alimentos – DCA/FEA. Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-862, Campinas/SP, Brasil.*

² *Food and Drug administration (FDA) 11510 W 80th St, Lenexa, KS, 66214, USA.*

³ *University of Missouri, Southwest Research Center, Mt. Vernon, MO 65712, USA.*

⁴ *Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia BR 465, Km 7, 23851-970, RJ/Brasil.*

⁵ *Universidade Federal do Oeste do Pará, 68035-180 Santarém, PA/Brasil.*

Manuscrito em preparo para ser submetido ao periódico Journal of Food Composition
Analysis

ABSTRACT

The compounds of 3,4-dihydroxybenzoic acid, caffeic acid, catechin, chlorogenic acid, epicatechin, *p*-coumaric acid, rutin, ferulic acid, quercetin and the mineral elements (Ca, K, Na, P, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn e Cr) were determined by UPLC-ESI (-)-MS/MS e ICP OES, respectively, in graviola (*Annona muricata*), atemoya (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.), fruta do conde (*Annona squamosa*), biribá (*Rollinia mucosa*) and the North American pawpaw (*Asimina triloba*). Catechin was only seen in atemoya, at a concentration of 38.6 $\mu\text{g/g}_{\text{dw}}$. Only 3,4-dihydroxybenzoic acid were seen in the fruit pulps of all five fruits. Atemoya stands out for not only having catechin, but also for having much more epicatechin (211 $\mu\text{g/g}_{\text{dw}}$) than the other fruits. At the same time, graviola had more *p*-coumaric acid (62.6 $\mu\text{g/g}_{\text{dw}}$) and the North American pawpaw had more chlorogenic acid (48.1 $\mu\text{g/g}_{\text{dw}}$) than the other fruits. All five fruit pulps had relatively high levels of potassium, with concentrations ranging from 7640 to 15000 $\mu\text{g/g}_{\text{dw}}$, with pawpaw being the lowest and atemoya being the highest. The concentrations of other metals ranged from: Ca (547 – 1110 $\mu\text{g/g}_{\text{dw}}$), Na (14.3 – 123 $\mu\text{g/g}_{\text{dw}}$), P (1210 – 1690 $\mu\text{g/g}_{\text{dw}}$), Mg (472 – 980 $\mu\text{g/g}_{\text{dw}}$), Mn (1.86 – 5.27 $\mu\text{g/g}_{\text{dw}}$), Zn (5.55 – 7.32 $\mu\text{g/g}_{\text{dw}}$). Pawpaw had the lowest concentrations of Ca and Mg, while fruta do conde had the highest. The results show that the consumption of these fruits could contribute significantly to providing recommended daily allowance of essential minerals and healthy antioxidants.

Keywords: Graviola, atemoya, fruta do conde, biribá, pawpaw, phenolics, mineral.

1. INTRODUCTION

Graviola (*Annona muricata*), atemoya (*A. squamosa* x *A. cherimola*), fruta do conde (*A. squamosa*), biribá (*Rollinia mucosa*) and the North American pawpaw (*Asimina triloba*) are in the Annonaceae family, which contains about 2400 species in 108 genera, based on the sequences of nucleotides on multiple plastid DNA loci (CHATROU et al., 2012). Graviola, atemoya, fruta do conde and biribá are also known as soursop, sugar apple, pineapple sugar apple and wild sweetsop, respectively. Soursop fruit is served in cafeterias in a Worker's Nutrition Program in Brazil (LUSTOSA et al., 2012), and it has been recommended for oral rehydration therapy due to it having >70% water and being a good source of potassium (ENWEANI et al., 2004). Both soursop and pawpaw have uses in folk remedies and traditional medicine, including treating cancer. Epidemiological studies showed that different parts of the plants and fruits of *Annonaceae* have been reported to have potent anticancer properties (CHEN et al., 2012; HAMIZAH et al., 2012). The health protecting properties of fruits have been mainly attributed to the presence of polyphenols (LAMPERI et al., 2008).

Polyphenols are secondary metabolites made by plants during their development (LAPORNIK et al., 2005; IGNAT et al., 2011). They are defined chemically as a quite diverse group of substances having an aromatic ring, one or more hydroxyls and other functional groups (DAI & MUMPER, 2010). Dietary phenolic compounds have received considerable attention in recent years, due to their health benefits, including antioxidant activity, antimutagenicity and antitumoral properties (PROESTOS et al., 2011; ROBLES-SÁNCHEZ et al., 2011). Studies have shown their ability to destroy free radicals that cause oxidative stress and subsequently damage tissues. The characterization of phenolic compounds in fruits is difficult due to the complexity of the matrix. This complexity led to the analysis of these compounds by liquid chromatography coupled to mass spectrometer in tandem (LC-MS/MS) in the selected reaction monitoring (SRM) mode. This technique has been shown to have excellent characteristics, such as sensitivity, selectivity, and specificity (LIU et al., 2010; SERGIEL et al., 2014).

Besides polyphenols, an important part of the nutritional information is the concentration of minerals that are important electrolytes. They help maintain proper organ function (especially the heart as well as central and peripheral nervous system). They are present in biological systems and play important roles in maintaining healthy functions needed by living organisms, such as oxygen transport, hormonal function, combating the

formation of free radicals and organizing the structures of biopolymers (PATRIARCA et al., 1998; SPAZIANI et al., 2006). Moreover, fruits, in general, are considered sources of essential minerals in the human diet (HARDISSON, et al., 2001). It is important to analyze fruits for their mineral content, including those that are toxic and those that are healthy. That is, iron is an essential metal that is especially important to premenopausal women, pregnant women and their infants (SMITH, 2014). However, it can be toxic in men over 50, since Fe^{2+} can react with hydrogen peroxide that is produced naturally in cells. The reaction produces the very toxic hydroxyl radical that can lead to various diseases caused by smoldering inflammation. This includes cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases and many types of cancer (SMITH, 2014, 2015). To achieve this analysis for metals, analytical techniques with sufficient sensitivity are required. Different techniques, such as flame atomic absorption spectroscopy (FAAS) or graphite furnace atomic absorption spectroscopy (GFAAS) (RADWAN, et al., 2006), have been employed for the determination of mineral elements in fruits. However, inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) are useful techniques for complete mineral profile determination of foods (SAVIKIN et al., 2014; BRAUCH, et al., 2016).

On the other hand, little or nothing is known about the various phenolic compounds or element mineral in these fruits. So, the aim of this study was to determine the phenolic compounds and mineral elements in *Annonaceae* fruits. This work is important for understanding the nutritional potential of these fruits and for expansion of their cultivation and use.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Plant Material

Graviola (*Annona muricata*) fruit pulp was from Rio de Janeiro, Brazil. Atemoya ‘Thompson’ cultivar (*A. cherimola* Mill x *A. squamosa* L.) fruit pulp was from Pilar do Sul, Brazil. Fruta do conde (*A. squamosa*) and biribá (*Rollinia mucosa*) fruit pulps were from Belém, Brazil. Pawpaw (*Asimina triloba*) fruits of the ‘Overleese’ cultivar were harvested from a research orchard in southwest Missouri, USA. About 25 fruits fully ripe were collected for analysis during the year 2013.

2.2. Chemicals and reagents

High purity methanol (CH₃OH) was obtained from Honeywell Burdick & Jackson (Muskegon, MI, USA). Liquid chromatography grade ethanol and acetonitrile (CH₃CN) were from J.T. Baker (Mexico City, D.F., Mexico). Formic acid was purchased from Merck Co. (Darmstadt, Germany). Water was purified in a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA). The compounds 3,4-dihydroxybenzoic acid, caffeic acid, catechin, epicatechin, *p*-coumaric acid, quercetin, rutin and ferulic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Chlorogenic acid was purchased from Biopurify phytochemicals Ltd. (Chengdu, China). Stock solutions of the phenolic compounds were prepared by dissolving the appropriate amount of each compound in ethanol to a final concentration of 1000 mg L⁻¹. Subsequent working solutions were prepared in ethanol at concentrations ranging from 0.05-5 mg·L⁻¹. All solutions were filtered through a 0.22 µm Fisherbrand cellulose membrane (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), stored at -80 °C and protected from light. Standards of calcium (Ca), potassium (K), sodium (Na), phosphorus (P), copper (Cu), iron (Fe), magnesium (Mg), manganese (Mn), zinc (Zn), cadmium (Cd) and nickel (Ni) were obtained from Inorganic Ventures (Christiansburg, VA) as stock standard solutions in 7% HNO₃ plus 3.5% HCl (v/v). They were diluted further to reach the concentrations needed to obtain calibration curves (0.5 – 500 µg/g, depending on the analyte).

2.3. Phenolic compound extraction procedure

To prepare for the analysis of phenolic compounds, about 10 g of each dried sample were accurately weighed and mixed with about enough HydroMatrixTM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) to reach the 100 mL mark in the sample cell used in an Accelerated Solvent Extractor (ASE), ThermoFisher Scientific, Sunnyvale, CA), as done previously on these and other lyophilized fruits (RICHARDS et al., 2014). Then, 40 mL of CH₃OH was added. The temperature and pressure were increased to 100 °C and 10.3 MPa over a 3 min time (static time). Next, the solvent was flushed out into a collection vessel. This was repeated three more times to obtain a total volume of about 160 mL. The solvent was evaporated off and the oil residue remaining was weighed and sent to UNICAMP for the UPLC-ESI (-) - MS/MS analysis of phenolic compounds. The residues were redissolved in methanol to concentrations of about 0.02 g/mL and filtered through a 0.22 µm Fisher brand cellulose membrane (Fisher Scientific) before injection on the chromatographic system.

2.4. Phenolic compounds assay by UPLC-MS/MS

Analyses were performed using an Acquity ultraperformance liquid chromatography system (UPLC), equipped with a binary pump system (Waters, Milford, MA, USA). A C₁₈ column (100 x 2.1 mm and 1.7 μ m particle size) from Phenomenex (Torrance, CA, USA) was used for the separation. The column temperature was maintained at 35 °C. The mobile phase consisted of two solvent mixtures. Solvent A was 0.1% formic acid in water and B was 0.1% formic acid in CH₃CN. The linear gradient elution program was: 0 min: 100% A, 9 min: 80.3% A, 9.1 min: 71.5% A, 12 min 65% A and 13 min: 100% A (equilibration time 1 min). The flow rate was 0.3 mL/min and the injection volume was 10 μ L.

The UPLC system was coupled to a Quattro Micro API triple quadrupole mass spectrometer (MS) from Waters (Manchester, U.K.) using a negative ion electrospray (ESI) source. The ionization source parameters were as follows: capillary voltage, 3.0 kV; source temperature, 120 °C; cone gas flow rate, 120L/h; desolvation gas flow rate 600L/h and desolvation temperature 400 °C. Nitrogen (>99% purity) and argon (>99.9% purity) were used as nebulizing and collision (product ion scan, MS/MS) gases, respectively. Then, analyses were conducted by selected reaction monitoring (SRM) in the negative ion mode, monitoring two transitions for each standard compound using a dwell time of 0.05 sec. Data acquisition was carried out with MassLynx v 4.1 software. The retention times of the analytes, as well as the *m/z* values of the precursor and product ions used for quantification, together with the cone voltage and collision energies that were used are shown in Table 1. Results are reported as μ g/g dry weight, or μ g/g-dw.

Table 1. LC-MS/MS Parameters for phenolic compounds

Compounds	t _r (min)	Q1 (m/z)	CV V	Q3 (m/z)	CE (V)	Q3 (m/z)	CE (V)
3,4-dihydroxybenzoic acid	3.80	153	25	109	15	81	25
Catechin	5.83	289	35	245	15	123	30
Chlorogenic acid	6.03	353	30	191	15	885	45
Caffeic acid	6.34	179	35	135	15	117	35
Epicatechin	7.03	289	35	245	15	109	25
<i>p</i> -coumaric acid	8.03	163	30	119	15	93	30
Ferulic acid	8.88	193	30	134	15	178	10
Rutin	9.40	609	60	300	40	271	50
Quercetin	11.35	301	45	151	20	179	20

t_r: Retention time; Q1; Precursor ion, [M-H]⁻; Q3: Product ions used for quantification; CV: Cone voltage; CE: Collision energy.

2.5. Mineral elements analysis

For sample digestion treatment with microwave assisted was used for the determination of the mineral elements (United States Department of Agriculture, 2013). A mass of 2.5 g freeze-dried was weighed in Teflon digestion vessel and 30 mL of nitric acid added and the mixture was sonicated for further 30 min. After that, the Teflon reactors were closed and placed inside the microwave oven. The following program was run: setp (1) 10 min to reach to reach 180 °C (1200 W), step (2) 10 min at 180 °C (1200 W), and step (3) cooling down (10 min). Care was taken to keep the samples from over-heating during digestion. After cooling to ambient temperature, the nitric acid solutions evaporated in the microwave until reduce volumes to approximately 1 mL. The following program was run: setp (1) 5 min to reach to reach 120 °C (600 W), step (2) 3.5 min at 120 °C (600 W), and step (3) cooling down (10 min).

Samples were diluted to 50 mL with ultra pure water and analyzed with a Varian Vista Pro simultaneous ICP spectrometer with axially viewed plasma, equipped with a cyclonic style spray chamber, a concentric SeaSpray glass nebulizer, a nebulizer gas mass flow controller, a three channel peristaltic pump and a Neslab CFT-33 refrigerated water cooler. The argon gas was 99% pure. The operating conditions of the ICP-OES equipment were as follow 15L/min of argon plasma gas flow rate, 1.5L/min of auxiliary gas flow rate, 1.0 L/min nebulizer gas flow rate and 1.2 KW of radio frequency (RF) power. Results are reported as $\mu\text{g/g-dw}$.

2.6. Evaluation methodology of some parameters

The linearity of the UPLC system was verified by constructing a calibration curve for each phenolic compound, using seven different concentrations that were spaced evenly from 0.05 to 5 mg/L. They standards were injected in triplicate and in ascending order of concentration and the limit of detection (LOD) was three times the signal to noise ratio (S/N) and the limit of quantification was six times the signal to noise ratio (S/N). The linearity of the metals analysis was verified by constructing a calibration curve for mineral elements, using six different concentrations from 0.5 to 500 $\mu\text{g/g}$.

2.8. Statistical treatment

The obtained results were compared by analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test in Statistica 7.0 (Statsoft, USA). The samples were considered to be significantly different when $p < 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The method was evaluated, and the figures of merit for the limits of detection and quantification along with the wavelengths of the lines used for the analysis and concentrations of standards used in the calibration curves are presented in Table 2. The analysis of variance showed that there was significant linear regression in the studied concentration ranges and that the regression equations did not present a lack of fit ($p > 0.05$), proving to be appropriate for quantifications.

Table 2. Figures of merite of mineral elements (ICP-OES) and phenolic compounds (UPLC-MS-MS).

	Analyte	λ (nm)	Curve ($\mu\text{g/g}$)	LOD mg/kg d.w	LOQ mg/kg d.w
Mineral elements	Ca	317.933	5-100	1.5	3
	K	404.721	10-200	1.87	3.74
	Na	330.237	10-500	3.78	7.56
	P	178.222	10-500	2.15	4.3
	Cu	324.754	0.5-10	0.026	0.052
	Fe	259.940	1.0-10	0.316	0.632
	Mg	383.829	5-100	0.222	0.444
	Mn	257.610	0.5-10	0.006	0.012
	Zn	213.857	0.5-25	0.306	0.612
	Cr	267.716	0.5-10	0.052	0.104
	Ni	231.604	0.5-10	0.032	0.064
Compounds	Catechin	-	0.05-5	0.128	0.257
	Chlorogenic acid	-	0.05-5	0.01	0.02
	Caffeic acid	-	0.05-5	0.01	0.02
	Epicatechin	-	0.05-5	0.03	0.077
	<i>p</i> -coumaric acid	-	0.05-5	0.007	0.015
	Ferulic	-	0.05-5	0.01	0.022
	Rutin	-	0.05-5	0.006	0.012
	Quercetin	-	0.05-5	0.004	0.01
	3,4-dihydroxybenzoic acid	-	0.05-5	0.008	0.017

For mineral elements LOD and LOQ =mg/Kg; curve= $\mu\text{g/g}$

For phenolic compounds LOD and LOQ = $\mu\text{g/mL}$; curve= $\mu\text{g/mL}$

The concentrations of nine phenolic compounds found in lyophilized atemoya, fruta do conde, soursop, biribá and the North American pawpaw fruit pulps are shown in Table 3. Catechin was only seen in atemoya, at a concentration of 38.6 $\mu\text{g/g-dw}$. Only 3,4-dihydroxybenzoic acid was seen in the fruit pulps of all five fruits. Atemoya stands out for not only having catechin, but also for having much more epicatechin (211 $\mu\text{g/g-dw}$) than the other fruits. At the same time, graviola had more *p*-coumaric acid (62.6 $\mu\text{g/g-dw}$) and the North American pawpaw had more chlorogenic acid (48.1 $\mu\text{g/g-dw}$) than the other fruits.

Table 3. Concentrations of phenolic compounds in lyophilized fruits of fruits in the *Annonaceae*

Compound	Atemoya	Fruta do conde	$\mu\text{g/g-dw}$		
			Soursop	Biribá	Pawpaw
3,4-dihydroxybenzoic acid	7.75±0.18 ^c	11.1±0.49 ^b	16.5±0.25 ^a	6.65±0.08 ^d	11.2±0.07 ^b
Catechin	38.6±0.72	ND	ND	ND	ND
Chlorogenic acid	ND	ND	ND	ND	48.1±1.2
Caffeic acid	ND	ND	7.75±1.08	ND	D
Epicatechin	211±2.2	ND	ND	ND	ND
<i>p</i> -coumaric acid	1.77±0.08 ^d	D	62.6±1.52 ^a	5.91±0.03 ^b	3.89±0.31 ^c
Ferulic acid	ND	7.61±0.23 ^b	5.39±0.30 ^c	7.41±0.33 ^b	11.6±0.05 ^a
Rutin	D	ND	ND	ND	1.63±0.05
Quercetin	ND	D	ND	ND	ND

ND: not detected; D: detected, but below the limit of quantitation.

Graviola and the North American pawpaw have been analyzed before by LC-MS/MS (JIMÉNEZ et al., 2014; BRANNEN et al., 2015). Of the nine phenolic compounds that were found in the current studies, only *p*-coumaric acid was found and quantified in graviola (at 4.69 mg/100 g-dw or 0.94 mg/100 g fresh weight) by previous workers (JIMÉNEZ et al., 2014). This compares to 62.6 $\mu\text{g/g-dw}$, or 6.26 mg/100 g-dw that was found in the current study. The different values could be partly due to the fact that different samples of graviola were analyzed in the previous and current studies. However, it could also be partly due to the fact that pressurized liquid extraction can solubilize much more material than other extraction methods (RICHARDS et al., 2013), including stirring a homogenized sample in methanol/0.1% HCl (v/v) at room temperature, which was done in the previous LC-MS/MS analysis (JIMÉNEZ et al., 2014; BRANNEN et al., 2015).

That previous study also tentatively identified three different coumaric acid hexoses, *p*-coumaric acid methyl esters, 5-caffeoylquinic acid (also known as neo-chlorogenic acid), dicaffeoylquinic acid, a cinnamic acid derivative, dihydrokaempferol-

hexoside, two caffeic acid derivatives, two feruloylglycosides, 4-feruloyl-5-caffeoylquinic acid and four other unidentified compounds in graviola (JIMÉNEZ et al., 2014). On the other hand, of the nine phenolic compounds that were found in the current studies in the North American pawpaw, only epicatechin was found and quantified in ten different varieties in a previous study (BRANNEN et al., 2015). Concentrations of epicatechin ranged from 29.8 to 163.8 mg/kg fresh weight of the fruit pulp, which had 71.1 to 76.6% moisture in that previous study (BRANNEN et al., 2015). The most (163.8 mg/kg) and the least (29.8 mg/kg) were in varieties with 74.1% and 71.9% moisture (BRANNEN et al., 2015). So, the concentrations of epicatechin can be converted to 221 and 44 mg/kg-dw (or $\mu\text{g/g-dw}$) in that previous study. This compares to 6.75 $\mu\text{g/g-dw}$ in the current study. On the other hand, the major phenolic compound found in pawpaws in the current study was 48.1 $\mu\text{g/g-dw}$ chlorogenic acid. The previous study also found a *p*-coumaroyl hexoside, 5-*O-p*-coumaroylquinic acid, a protocatechuic acid hexoside, three different procyanidin dimers, four procyanidin trimers, protocatechuic acid hexoside and five unidentified compounds (BRANNEN et al., 2015).

The mineral elements, including Ca, K, Na, P, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn, Cr and Ni, of the pulps of atemoya, fruta do conde, soursop, biribá, pawpaw are shown in Table 4

Table 4. Concentrations of mineral in lyophilized fruits of plants in the Annonaceae family

Elements	Atemoya	Fruta do conde	Soursop	Biribá	Pawpaw
	$\mu\text{g/g-dw}$				
Ca	810	1110	671	815	547
K	15000	11000	14900	8230	7640
Na	123	14.3	109	20.6	17.0
P	1380	1690	1210	1480	1210
Cu	6.12	2.73	7.62	1.75	6.17
Fe	12.3	7.44	10.5	8.41	11.7
Mg	980	721	938	750	472
Mn	4.70	1.86	5.27	2.60	3.51
Zn	7.14	5.66	6.20	7.32	5.55
Cr	0.587	0.235	0.154	0.220	0.13
Ni	0.234	0.050	0.307	0.046	0.39

All five fruit pulps had relatively high levels of potassium, with concentrations ranging from 7640 to 15000 $\mu\text{g/g-dw}$, with pawpaw being the lowest and atemoya being the highest. Thus, fruits of *Annonaceae* may be a good source of potassium compared to banana, which is popularly known as a source of K. This element is essential to maintain body water content and acid balance (MIR-MARQUÉS et al., 2015) and insufficient intake of K may raise the risk of cardiovascular disease (OTTEN et al., 2006).

Among the pulp samples, the concentration of minerals was found to range between 547 (pawpaw) and 1110 $\mu\text{g/g-dw}$ (fruta do conde) for Ca, 14.3 (fruta do conde) and 123 $\mu\text{g/g-dw}$ (atemoya) for Na, 1210 (soursop) and 1690 $\mu\text{g/g-dw}$ (fruta do conde) for P, 1.75 (biribá) and 7.62 $\mu\text{g/g-dw}$ (soursop) for Cu, 7.44 (fruta do conde) and 12.3 $\mu\text{g/g-dw}$ (atemoya) for Fe, 472 (pawpaw) and 980 $\mu\text{g/g-dw}$ (atemoya) for Mg, 1.86 (fruta do conde) and 5.27 $\mu\text{g/g-dw}$ (soursop) for Mn, 5.55 (pawpaw) and 7.32 $\mu\text{g/g-dw}$ (biribá) for Zn, 0.13 (pawpaw) and 0.58 $\mu\text{g/g-dw}$ (atemoya) for Cr, 0.046 (biribá) and 0.39 $\mu\text{g/g-dw}$ (pawpaw).

There are other reports on the fruits mineral elements concentrations in the *Annonaceae* family. According to De Souza et al. (2012) soursop pulp presented value of Mg (894 $\mu\text{g/g-dw}$) is very similar to the values reported here, the levels of P (1210 $\mu\text{g/g-dw}$), Ca (671 $\mu\text{g/g-dw}$) and K (14900 $\mu\text{g/g-dw}$) were lower, and the Fe (10.5 $\mu\text{g/g-dw}$) content was higher. For the atemoya, da Cruz (2011) found 1.70 mg/100g-dw, while found 1.50 mg/100g-dw (15000 $\mu\text{g/g-dw}$) for K. Jiménez et al. (2014) found 0.15, 0.13 and 0.12 mg/100g-dw for P, Ca and Mg compared to 1.38, 0.81, and 0.98 mg/100g-dw, respectively (1380, 810 and 980 $\mu\text{g/g-dw}$) in this study. Biriba had the highest concentration of Zn (7.32 $\mu\text{g/g-dw}$), however this concentration was lower to that found by Berto et al. (2015).

Nickel, which is not a micronutrient, but a potentially toxic metal, was quite low in all samples described in that study. So, they all may be good for rehydration therapy, even though the Brazilian Workers Program encourages workers to eat graviola (LUSTOSA et al., 2012). So, our results indicate that the other fruits that we analyzed may also be good for rehydration therapy.

Obtained the concentrations of the mineral elements was possible to calculate the percentage contributions of fruits analyzed in relation to the recommended daily intake (RDI) for essential elements (FAO / WHO, 2002; INSTITUTE OF MEDICINE, 2002-2005). These data, considering the nutritional requirements of an adult, are shown in Table 5. The average fruits weight was 300g, except for soursop, which was selected 1/4 of its total weight, approximately.

Table 5: Contribution of one portion of fruit per day to the recommended daily allowance of essential elements.

Element	RDA	RDA percentage provide by one portion (300 g)				
		Atemoya	Fruta do conde	Soursop	Biribá	Pawpaw
Ca	800	6	8	5	6	4
K	4700	19	14	19	11	10
Na	2400	0,31	0,04	0,27	0,05	0,04
P	580	14	15	13	15	13
Cu	0,7	52	23	65	15	53
Fe	6	12	7	11	8	12
Mg	350	17	12	16	13	8
Zn	7,6	6	4	5	6	4

RDA values in mg, obtained from FAO/WHO (2002), Institute of Medicine (2002-2005).

In general, fruits showed enough copper concentrations to supply 15% of the RDA (biriba) until 65% of the RDA (soursop), being considered sources of this nutrient, similar results were observed by Almeida et al. (2009), which classified the fruta do conde as an excellent source of copper. As for the K, content of all fruits contributed more than 10% of RDA, especially the atemoya and soursop (19% RDA). The contribution of magnesium, phosphor and iron was between 4% to 17% of the RDA, whereas calcium e zinc showed low concentrations (< 8% of RDA). The contribution of sodium is negligible (average, 0.1%).

4. CONCLUSION

All five fruits in the *Annonaceae* family that were analyzed in this study showed a several phenolic compounds. Only 3,4-dihydroxybenzoic acid were seen in the fruit pulps of all five fruits and catechin was only seen in atemoya. Atemoya stands out for not only having catechin, but also for having much more epicatechin than the other fruits. At the same time, graviola had more *p*-coumaric acid and the North American pawpaw had more chlorogenic acid than the other fruits. All five fruits provide high levels of potassium (10-19% of the RDA) and copper (15-65% of the RDA), and very low levels of zinc and sodium. Fruits of *Annonaceae* could be a healthy option for people with heart diseases and hypertension as well as the winder population.

5. REFERENCES

- ALMEIDA, M. M. B.; SOUZA, P. H. M.; FONSECA, M. L.; MAGALHAES, C. E. C.; LOPES, M. F. G.; LEMOS, T. L. G. Evaluation of macro and micro-mineral content in tropical fruits cultivated in the northeast of Brazil. **Food Science and Technology**, v. 29, p. 581-586, 2009.
- ANGIBAUD, G.; GAULTIER C.; RASCOL O. Atypical parkinsonism and Annonaceae consumption in New Caledonia. **Movement Disorders**, v. 19, p.603–604. 2004.
- BRANNEN, R. G.; PETERS, P.; TALCOTT, S. T. Phytochemical analysis of ten varieties of pawpaw (*Asimina triloba* [L.] Dunal) fruit pulp. **Food Chemistry**, v. 168, 656–661, 2015.
- BRAUCH, J. E., BUCHWEITZ, M., SCHWEIGGERT, R. M., CARLE, R. Detailed analyses of fresh and dried maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) berries and juice. **Food Chemistry**, v. 190, p. 308-316, 2016.
- CAPARROS-LEFEBVRE, D.; LEES, A. J. Atypical unclassifiable parkinsonism on Guadeloupe: an environmental toxic hypothesis. **Movement Disorders**, v. 20, p.114-8, 2005.
- CAPARROS-LEFEBVRE, D.; ELBAZ, A. Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: a case-control study. **Lancet**, v. 354, 281-286, 1999.
- CHATROU, L. W.; PIRIE, M. D; ERKENS, R. H. J.; COUVREUR, T. L. P.; NEUBIG, K. M.; ABBOTT, J. R.; MOLS, J. B.; MAAS, J.W.; SAUNDERS, R. M. K.; CHASE, M.W. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, 5–40, 2012.
- CHAUDHURI, K. R; HU, M. T.; BROOKS D. J. Atypical parkinsonism in Afro-Caribbean and Indian origin immigrants to the UK. **Movement Disorders**, v. 15, p. 18 – 23, 2000.
- CHEN, Y.; CHEN, J. W; XU, S. S.; WANG, Y.; LI, X.; CAI, B. C.; FAN, N. B. Antitumor activity of annonaceous acetogenins in HepS and S180 xenografts bearing mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 2217-2219, 2012.
- DA CRUZ, L.C. 2011. **Caracterização física e química da casca, polpa e semente de atemoia ‘Genfer’**. Dissertation. Federal University of Lavras: Lavras, Brazil. p. 47.
- DAI, J., MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, p. 7313-7352, 2010.
- DE MORAES, I. V. M.; RIBEIRO, P. R. V.; SCHMIDT, F. L.; CANUTO, K. M.; ZOCOLO, G. J.; DE BRITO, E. S.; LUO, R.; RICHARDS, K. M.; TRAN, K.; SMITH, R. E. UPLC-MS and NMR Analyses of Graviola (*Annona muricata*) Leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 2, p. 174-179, 2016

DE SOUZA, V. R.; PEREIRA, P. A. P.; QUEIROZ, F.; BORGES, S. V.; CARNEIRO, J. D. S. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, v. 134, p. 381-386, 2012.

ENWEANI, I. B.; OBROKU, J.; ENAHORO, T.; OMOIFO, C. The biochemical analysis of soursop (*Annona muricata* L.) and sweetsop (*A.squamosa* L.) and their potential use as oral rehydration therapy. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 2, p. 39-43, 2004.

FAO/WHO Human vitamin and mineral requirements. **Report of a joint FAO/WHO expert consultation Bangkok**, Thailand, 2002.

FORMAN, H. J.; DAVIES, K. J.; URSINI, F. How do nutritional antioxidants really work: Nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging *in vivo*. **Free Radical Biology and Medicine** v. 66, p. 24-35, 2014.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox: less paradoxical now? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, p. 637-644, 2012.

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

HANSRA, D. M.; SILVA, O.; MEHTA, A.; AHN, E. Patient with metastatic breast cancer achieves stable disease for 5 years on graviola and Xeloda after progressing on multiple lines of therapy. **Advances in Breast Cancer Research**, v.3, p. 84-87, 2014.

HÖLLERHAGE, M.; RÖSLER, T. W.; BERJAS, M.; LUO, R.; TRAN, K.; RICHARDS, K. M.; SABAA-SRUR, A. U.; MAIA, J. G.; MORAES, M. R.; GODOY, H. T.; ÖGLINGER, G. U.; SMITH, R. E. Neurotoxicity of dietary supplements from Annonaceae species. **International Journal of Toxicology in press**, v. 34, p. 543-550, 2015.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1821-1835, 2011.

INSTITUTE OF MEDICINE, Dietary reference intakes (DRIs): Estimated average requirements. **National Academy of Sciences**, Washington, 2002-2005.

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

KELL, D. B. Towards a unifying, systems biology understanding of large-scale cellular death and destruction caused by poorly liganded iron: Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's, prions, bactericides, chemical toxicology and others as examples. **Archives of Toxicology**, v.84, p. 825-889, 2010.

LAMPERI, L.; CHIUMINATTO, U.; CINCINELLI, A.; GALVAN, P.; GIORDANI, E.; LEPRI, L.; DEL BUBBA, M. Polyphenol levels and free radical scavenging activities of four apple cultivars from integrated and organic farming in different Italian areas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 6536–6546, 2008.

LANNUZEL, A.; HOGLINGER, G. U.; VERHAEGHE, S.; GIRE, L.; BELSON, S.; ESCOBAR-KHONDIKER, M.; POUILLAIN, P.; OERTEL, W. H.; HIRSCH, E. C.; DUBOIS, B.; RUBERG, M. Atypical parkinsonism in Guadeloupe: a common risk factor for two closely related phenotypes? **Brain**, v.130, p. 816–827, 2007.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A. G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering** v. 71, p. 214-222, 2005.

LEVINE, R. A.; RICHARDS, K. M.; TRAN, K.; LUO, R.; THOMAS, A. L.; SMITH, R. E. Determination of neurotoxic acetogenins in pawpaw (*Asimina triloba*) fruit by LC-HRMS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 1053-1056, 2015.

LIU, W.; KONG, Y.; ZU, Y.; FU, Y.; LUO, M.; ZHANG, L.; LI, J. Determination and quantification of active phenolic compounds in pigeon pea leaves and its medicinal product using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 4723-4731, 2010.

LÚCIO, A. S. S. C.; ALMEIDA, J. R. G. S.; DA CUNHA, E. V. L.; TAVARES, J. F.; FILHO, J. M. B. Alkaloids of the Annonaceae: Occurrence and a compilation of their biological activities. **Alkaloids Chemistry and Biology**, v.74, p. 233-409, 2015.

LUO, R.; MAIA, G. S.; DE MORAES, M. R.; GODOY, H. T.; SABAA-SUR, A.; TRAN, K.; RICHARDS, K. M.; MONROE, D. M.; VOCQUE, R. H.; SMITH, R. E. NMR analysis of potentially neurotoxic Annonaceous fruits. **The Natural Products Journal**, v. 3, p. 230-241, 2013.

LUSTOSA, M.M.; BARROSO, C. B.; VAREDA, T. F.; CARVALHO, N. P. Comparative analysis of fruit and vegetable consumption in a food service unit: Is it possible to influence the choices? **The Natural Products Journal**, v. 2, p. 161-163, 2012.

OTTEN, J.; HELLWING, J.; MEYERS, L. Dietary intakes (DRI). The essential guide to nutrient requirements. **The National Academies Press**, Washington, 2006.

PROESTOS, C.; BOZIARIS, I. S.; NYCHAS, G. J. E.; KOMAITIS, M. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 95, p. 664-671, 2006.

RADWAN, M. A.; SALAMA, A. K. Market basket survey for some heavy metals in Egyptian fruits and vegetables. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 1273–1278, 2006.

RICHARDS, K. M.; TRAN, K.; LEVINE, R. A.; LUO, R.; MAIA, J. G. S.; SABAA-SURUR, A. A. U.; MACIEL, M. I. S.; MELO, E. A.; DE MORAES, M. R.; GODOY, H. T.; CHAVES, M. A.; SACRAMENTO, C. K.; THOMAS, A. L.; MONROE, D.; SMITH, R.

E. Improved extraction of soluble solids from fruits. **The Natural Products Journal**, v. 4, p. 201-210, 2014.

ROBLES-SÁNCHEZ, M.; ASTIAZARÁN-GARCÍA, H.; MARTÍN-BELLOSO, O.; GORINSTEIN, S.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; ROSA, L. A.; YEPIZ-PLASCENCIA, G.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Influence of whole and fresh-cut mango intake on plasma lipids and antioxidant capacity of healthy adults. **Food Research International**, v. 44, p. 1386-1391, 2011.

SAVIKIN, E.; ŽIVKOVIĆ, J.; ZDUNIĆ, G.; GODEVAC, D.; DORDEVIĆ, B.; DOJCINOVIĆ, B.; DORDEVIĆ, N. Phenolic and mineral profiles of four Balkan indigenous apple cultivars monitored at two different maturity stages. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 35, p. 101-111, 2014.

SERGIEL, I.; POHL, P.; BIESAGA, M. Characterisation of honeys according to their content of phenolic compounds using high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 145, p. 404-408, 2014.

SMITH, R. E. Medicinal Chemistry – Fusion of Traditional and Western Medicine, 2nd edition; Bentham Science; Sharjah, U.A.E. 2014, pp. 223-224.

SMITH, R. E. Medicinal Chemistry – Fusion of Traditional and Western Medicine, 3rd edition; Bentham Science; Sharjah, U.A.E. 2015, pp. 55-69.

United States Department of Agriculture. Determination of Metals by ICP-MS and ICP-OE (Optical Emission Spectrometry). 2013, 21 pp.

CAPÍTULO V

PERFIL QUANTITATIVO DE TOCOFEROIS E ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS DA SEMENTE DE ATEMÓIA

QUANTITATIVE PROFILE OF TOCOPHEROLS AND METHYL ESTERS OF FATTY ACID OF ATEMOYA SEED

Maria Rosa de Moraes¹, Wellington da Silva Oliveira¹, Danilo Souza¹ e Helena Teixeira Godoy¹

¹ *Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Rua Monteiro Lobato, 80, Laboratório de Análise de Alimentos – DCA/FEA. Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-862, Campinas/SP, Brasil.*

Manuscrito em preparo para ser submetido ao periódico Food Research International

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi determinar a composição dos ácidos graxos, assim como quantificar os isômeros de tocoferol no óleo da semente dos frutos de atemóia, provenientes de duas safras (2012 e 2013). O perfil dos ácidos graxos foi obtido através de cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chama (GC-FID) e a confirmação dos mesmos foi realizada por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Foram analisados quatro dos isômeros da vitamina E (tocoferóis) através da técnica da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com fase normal e um detector de fluorescência. Os resultados obtidos demonstraram que a composição em ácidos graxos no óleo da semente de atemóia apresenta quantidades significativas de ácidos graxos insaturados (aproximadamente 80%, sendo 43% monoinsaturados e 36% de polinsaturados), com a predominância do ácido oléico e do ácido linoléico. Com relação aos tocoferóis, foram identificados e quantificados o α -tocoferol (18,9 mg/Kg_{óleo}) e o γ -tocoferol (90,5 mg/Kg_{óleo}). Os resultados demonstraram que a semente da atemóia pode se fonte desses compostos bioativos, os quais poderiam ser explorados por indústrias alimentícias, farmacêuticas e químicas, além de atrair a atenção de indústrias de processamento de alimentos, de modo a direcionar melhor os seus subprodutos.

Palavras chaves: *Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L., óleo, compostos bioativos.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the composition of fatty acids, as well as quantify the isomers of tocopherol in the seed oil of fruit atemoya, from two crops (2012 and 2013). The fatty acid profile was obtained by gas chromatography coupled to a flame ionization detector (GC-FID) and their confirmation was performed by gas chromatography-mass spectrometry. We analyzed the four isomers of vitamin E (tocopherols) through liquid chromatography of high efficiency technique (HPLC) on normal phase and fluorescence detection. The results showed that the fatty acid composition in oil atemoya seed has significant amounts of unsaturated fatty acids (approximately 80%, being 43% monounsaturated and 36% polyunsaturated), with a predominance of oleic acid and linoleic acid. With respect to the tocopherols have been identified and quantified the α -tocopherol (18.9 mg/Kg_{oil}) and γ -tocopherol (90.5 mg / Kg_{oil}). The results showed the atemoya seed can be a source of these bioactive compounds, which could be utilized by food, pharmaceutical and chemical industries, in order to better target their products.

Keywords: *Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L., oil, bioactive compounds.

1. INTRODUÇÃO

A atemóia (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.) é um híbrido proveniente do cruzamento interespecífico entre a cherimóia e a fruta do conde, ambos pertencentes à família *Annonaceae* e amplamente cultivada nos trópicos americanos (Pino, 2010). É um fruto com formato cônico, superfície protuberante e polpa branca com sabor adocicado quando maduro (Liu, Chao, Peng, & Yang, 2016). As sementes têm coloração escura, representam cerca de 8% do peso do fruto e têm grande potencial como inseticida botânico (Seffrin, Shikano, Akhtar, & Isman, 2010), além de efeito citotóxico contra as células cancerígenas (Cruz, Lima, Abreu, Corrêa, & Pinto, 2013). Embora tenha grande potencial para o processamento, a atemóia é consumida principalmente na forma *in natura* e as sementes são descartadas como resíduos, assim como ocorre com muitos frutos tropicais.

A geração de resíduos por conta da subutilização da matéria-prima tem se tornado uma preocupação mundial, além de resultar em perdas financeiras para a agroindústria. Muitos desses resíduos podem ser incorporados na dieta humana, uma vez que são ricos em nutrientes e outros compostos com propriedades funcionais (Schieber, Stintzing, & Carle, 2001; Silva & Jorge, 2014).

A investigação de óleos especiais provenientes de frutas e seus subprodutos é um campo de pesquisa emergente, ainda pouco explorado. Por conta da presença de compostos bioativos que desempenham um fator preventivo em várias doenças cardiovasculares e degenerativas, o estudo destas frações lipídicas tem sido foco de diversas pesquisas nos últimos anos (Ayala-Zavala et al., 2011; Fadavi, Barzegar, & Hossein Azizi, 2006; Silva & Jorge, 2014; Villaverde et al., 2013).

De maneira geral, os óleos vegetais são classificados em saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, dependendo da presença e número de duplas ligações na cadeia de ácidos graxos. A alimentação rica em ácidos graxos insaturados, como o ácido oléico, linolênico e linoléico, por exemplo, auxilia na diminuição plasmática das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), sem redução das lipoproteínas de alta densidade (HDL), além de reduzir os níveis de triglicerídeos plasmáticos, promovendo um efeito benéfico à saúde, como prevenção de câncer e doenças cardiovasculares (Ayala-Zavala et al., 2011; Binkoski, Kris-Etherton, Wilson, Mountain, & Nicolosi, 2005). Frutas da família das anonáceas, como a graviola e a fruta do conde, possuem em sua composição o ácido oléico e o ácido linoléico como os principais ácidos graxos insaturados (Rana, 2015; Silva & Jorge, 2014).

Além dos ácidos graxos, a fração lipídica das sementes de frutas pode conter quantidades significativas de tocoferóis que confere potencial antioxidante. Os tocoferóis são classificados como α -, β -, γ -, δ -tocoferol, dependendo do número e da posição dos grupos metilas ligados ao anel aromático (Dunford, 2001), porém o α -tocoferol desempenha maior atividade biológica (Karmowski, Hintze, Kschonsek, Killenberg, & Böhm, 2015). A principal função dos tocoferóis consiste em proteger os ácidos graxos insaturados da oxidação lipídica, principalmente pela sua capacidade em doar hidrogênio aos radicais livres lipídicos, fazendo com que a oxidação em cadeia seja interrompida (Szymańska & Kruk, 2008), mostrando desta forma um papel importante no processo aterogênico (Elmadfa & Wagner, 2003). García-Salas et al. (2016) avaliando a composição lipídica das diferentes partes da cherimóia verificaram que as maiores concentrações de tocoferóis foram observadas na semente do fruto, sendo quantificado o α -tocoferol e o δ -tocoferol.

Com base nessas informações o estudo dos compostos lipofílicos de fontes alternativas de óleos vegetais torna-se um campo bastante promissor, visto que estudos relacionados à ingestão desses compostos mostram efeitos benéficos à saúde, além de aproveitar um resíduo que poderia favorecer a degradação ambiental, caso não fosse devidamente tratado (Lutterodt, Slavin, Whent, Turner, & Yu, 2011). Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi determinar a composição dos ácidos graxos assim como avaliar e quantificar os isômeros de tocoferol na semente dos frutos de atemóia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria Prima

Os frutos de atemóia, cultivar Thompson, foram colhidos no município de Pilar do Sul-SP, nos anos de 2012 e 2013. Após a aquisição, as sementes foram separadas da polpa por uma despoldadeira de escova e em seguida foram congeladas e liofilizadas. As sementes liofilizadas foram trituradas em moinho analítico e acondicionadas em embalagens, seladas a vácuo (livres de oxigênio) e armazenadas em freezer (-18°C) até o momento da análise.

2.2 Reagentes e soluções padrões

Os reagentes de grau analítico utilizados foram: acetato de etila, hexano e isopropanol (Syth, Brasil), cloreto de sódio (Vetec, Brasil), solução de trifluoreto de boro

(BF₃) a 12% em metanol (Merck, Brasil) ebutil-hidroxitolueno (BHT) (Synth, Brasil), enquanto que os reagentes de grau HPLC foram: hexano e isopropanol (Mallinckrodt, EUA) e ácido acético (Merck, Brasil). Os padrões de ésteres metílicos do C₄ ao C₂₄ foram adquiridos da FAME Mix 37 (Supelco, EUA) e o α -, β -, γ -, e δ -tocoferol da Calbiochem®, EMD Biosciences, Inc. (EUA).

As soluções estoque foram preparadas por dissolução dos tocoferóis em hexano contendo 0,01% de BHT nas concentrações de 100 mg L⁻¹. A solução estoque de ésteres metílicos de ácidos graxos foi preparada em hexano grau HPLC, na concentração de 1000 mg L⁻¹ armazenada em ultrafreezer a -86 °C até o momento da análise.

2.3 Preparo de amostra

2.3.1 Extração de lipídeos

A extração de lipídeos pela metodologia de Bligh & Dyer (1959) é um método de extração a frio caracterizado por minimizar os danos à qualidade da matéria graxa extraída (BRUM et al., 2009). Utiliza-se uma mistura binária de metanol e clorofórmio que tem a capacidade de extrair tanto os lipídeos neutros quanto os lipídeos polares. Aproximadamente 1,5 g de amostra liofilizada foi pesada em tubos de ensaio com tampa. Adicionou-se 7,5 mL de clorofórmio, 15 mL de metanol e 6 mL de água. Os tubos foram agitados por 15 min e posteriormente foi adicionado 7,5 mL de clorofórmio e 7,5 mL de sulfato de sódico (1.5%). Os tubos foram novamente agitados por 2 min e centrifugados a 3000 rpm por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a fase inferior foi filtrada em papel tipo Watman nº1, com aproximadamente 1 g de Na₂SO₄ anidro. O filtrado foi evaporado até a secura com N₂. O óleo obtido foi armazenado em ultrafreezer-86 °C até o momento da análise.

2.3.2 Ésteres metílicos de ácidos graxos

A derivatização dos ácidos graxos em ésteres metílicos de ácidos graxos foi feita a partir dos métodos propostos por Joseph & Ackman (1992) e Ballus et al. (2014). Cerca de 25 mg de óleo extraído da semente foi pesado em tubos de ensaio com tampa e adicionados 4 mL de NaOH 0,5 mol L⁻¹ em solução com metanol. Os tubos foram aquecidos em banho a uma temperatura de 100 °C por 10 minutos até a obtenção de uma solução transparente.

Posteriormente, foram adicionados aos tubos, 3 mL de BF₃ 12% em solução com metanol e levados novamente ao aquecimento por 5 minutos. Depois de resfriados à temperatura ambiente, 4 mL de uma solução saturada de NaCl foi adicionada no tubo sob agitação. Em seguida, 4 mL de hexano foi adicionado e submeteu toda a mistura a uma agitação vigorosa em vórtex. Os tubos foram repousados até a separação das fases. A fase superior foi recolhida e o resíduo foi lavado com 2 mL de hexano por 3 vezes. As fases recolhidas foram misturadas e concentradas até a secura em evaporador rotativo e ressuspensa em 2 mL de hexano. A extração foi realizada em triplicata (n=3) e o extrato foi armazenado em ultrafreezer a -86 °C até o momento da análise.

2.3.3 Tocoferóis

Para análise de tocoferóis, foi aplicado o método utilizado no trabalho de Ballus et al. (2014). Aproximadamente 20 mg de óleo obtido da semente de *Atemóia* foi diluído em 2 mL de hexano contendo 0,01% de BHT. A solução foi filtrada em membrana de PVDF de 0,22 µm (Millipore, USA), e injetada em um HPLC com detector de fluorescência. Todos os extratos foram preparados em triplicatas.

2.4 Métodos de Separação

2.4.1 Ésteres metílicos de ácidos graxos: identificação e quantificação

Para as análises cromatográficas utilizou-se o método de Ballus et al. (2014). Um cromatógrafo a gás Agilent 7890, equipado com detector de ionização de chama (FID), operando com razão de split 1:50 e uma coluna capilar de sílica fundida DB-23 (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura de filme) foram usadas para determinação de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES). Os parâmetros utilizados para determinação foram temperatura do injetor (250 °C), temperatura do detector (280 °C), H₂ como gás de arraste com vazão de 1,0 mL min⁻¹, e no detector (H₂: N₂: ar sintético - 30: 30: 300 mL.min⁻¹). A rampa de temperatura foi iniciada com 50 °C passando para 175 °C com taxa de ajuste de 25 °C/min, totalizando 35,5 min de corrida. A identificação dos picos foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos padrões com os tempos de retenção dos compostos encontrados nas amostras, nas mesmas condições de separação. Os resultados da área são expressos em porcentagem de

área total, ou seja, área do pico de um determinado ácido graxo em relação à área total (somatório da área de todos os picos de ácidos graxos).

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados no espectrômetro de massas, utilizando ionização por elétrons a 200 °C e quadrupolo a 150 °C no modo *scan*, na qual foram monitorados os íons gerados entre 50 e 500m/z. A separação dos ésteres foi realizada em uma coluna HP-5 (30 m x 0,32 mm x 0,50 µm). Para tanto, 1 µL das amostras foi injetada em modo *split* (1:45), com injetor à 250°C, e programação de temperatura do forno iniciando a 50°C, incrementando 1°C/min até 110°C, seguido de aquecimento a 3 °C/min até 310 °C, na qual foi mantido por 3 min. A vazão do gás de arraste (He) foi ajustado para 0,5 mL/min. A identificação foi realizada através da biblioteca NIST11[®] e dos padrões analíticos injetados nas mesmas condições.

2.4.2 Tocoferóis: identificação e quantificação

Os tocoferóis foram analisados utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência, Agilent 1100 (Agilent Technologies, Alemanha), acoplado a um detector de fluorescência, sistema de bomba quaternária, injetor automático e forno para controlar a temperatura da coluna. As quantificações foram realizadas de acordo com os métodos de Ballus et al. (2014) e Pinheiro-Sant'ana et al. (2011), utilizando uma coluna Hypersilica (150 mm x 4.6 mm x 3.0µm), em fase normal. A fase móvel consistiu de um sistema isocrático composto de hexano: isopropanol: ácido acético (98,9: 0,6: 0,5) com vazão de 1,0 mL min⁻¹. O volume injetado foi de 5µL, a temperatura da coluna foi mantida a 30 °C e a detecção foi realizada no detector de fluorescência utilizando $\lambda_{\text{excitação}}$ 290 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 330 nm. A identificação foi feita por comparação dos tempos de retenção dos compostos encontrados nas amostras com o padrão dos homólogos do tocoferol separados sob as mesmas condições, bem como por co-cromatografia. Todas as amostras foram injetadas em triplicatas.

2.5 Avaliação de alguns parâmetros da metodologia

Ambos os métodos foram validados em nosso laboratório por Ballus et al. (2014). No entanto, para a quantificação dos tocoferóis alguns parâmetros foram reavaliados, como a linearidade, precisão instrumental, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ). A linearidade foi verificada através da construção de curva analítica com sete pontos espaçados de forma equidistante, injetados aleatoriamente, todos em triplicata. O limite de detecção (LOD) foi determinado como sendo a concentração do analito que resultou em um sinal três

vezes maior que o ruído do sistema cromatográfico, enquanto que o limite de quantificação foi considerado como sendo a concentração do analito que resultou em um sinal seis vezes maior que o ruído. Para cada uma das curvas geradas, foi realizado a análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$) com intuito de verificar a significância do modelo gerado e de sua falta de ajuste. A precisão instrumental foi verificada através do coeficiente de variação da área de dez injeções realizadas no limite de quantificação ($n=10$), em um mesmo dia.

2.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 95% de confiança, usando o software Statistica 7.0 (Statsoft, USA). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram apresentados com a média e o desvio padrão

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ésteres metílicos de ácidos graxos

Doze ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados e quantificados utilizando GC-FID (Tabela 1). O ácido oléico (43%) e o ácido linoléico (34,1%) foram os ácidos graxos majoritários na semente de atemóia, seguido dos ácidos palmítico (13,5%) e esteárico (6,0%).

Resultados semelhantes foram observados para a semente da fruta do conde (*Annona squamosa*), em que os principais ácidos variaram na mesma proporção (Rana, 2015). Silva, Jorge (2014) também observaram a predominância de ácidos graxos insaturados nos óleos de sementes de resíduos agroindustriais, como sementes de graviola (*Annona muricata*), na qual os principais ácidos graxos identificados foram o ácido oléico (43,3%) e ácido linoléico (29,7%).

Tabela 1: Teor dos ésteres metílicos de ácidos graxos (% da área relativa) obtidos da semente da atemóia referente à safra de 2012 e 2013.

Ácidos Graxos	Safra 2012	Safra 2013
Ácido mirístico (14:0)	0,06±0,003 ^{fA}	0,05±0,03 ^{fB}
Ácido palmítico (16:0)	13,6±0,564 ^{cA}	13,56±0,124 ^{cA}
Ácido palmitoléico (16:1 n-7)	0,18±0,004 ^{fB}	0,20±0,002 ^{fA}
Ácido heptadecanóico (17:0)	0,20±0,010 ^{fA}	0,18±0,014 ^{fA}
Ácido esteárico (18:0)	5,64±0,190 ^{dB}	6,48±0,204 ^{dA}
Ácido oléico (18:1 n-9)	40,73±0,690 ^{aB}	45,09±0,320 ^{aA}
Ácido linoléico (18:2 n-6)	36,31±0,288 ^{bA}	31,91±0,417 ^{bB}
Ácido linolênico (18:3 n-3)	1,77±0,145 ^{eB}	1,20±0,041 ^{eA}
Ácido araquidídico (20:0)	0,79±0,067 ^{fA}	0,75±0,087 ^{eA}
Ácido 11-eicosenoico (20:1n-9)	0,20±0,018 ^{fA}	0,19±0,087 ^{fA}
Ácido beênico (22:0)	0,31±0,011 ^{fA}	0,25±0,019 ^{fB}
Ácido lignocérico (24:0)	0,19±0,007 ^{fA}	0,15±0,021 ^{fB}
Saturados (%)	20,8 ^b	21,4 ^b
Insaturados (%)	Monoinsaturados	41,1 ^b
	Poliinsaturados	38,1 ^a
		45,5 ^a
		33,1 ^b

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não apresentam diferenças significativa entre si a $p < 0,05$ pelo teste de Tukey.

Com relação ao teor de ácidos graxos saturados e insaturados, a Tabela 1 mostra que aproximadamente 21% correspondem aos saturados e 79% correspondem aos insaturados (sendo, em média, 43 % monoinsaturados e 35,6 % poliinsaturados), composição similar foi encontrada por Rana (2014) para as sementes da fruta do conde. A qualidade do óleo vegetal está diretamente relacionada à grande predominância de ácidos graxos insaturados, por conta da sua grande importância na saúde humana e animal. Por outro lado, o grau de saturação está relacionado à depreciação do produto. Estudos recentes sugerem que, em ratos, os ácidos graxos insaturados podem atuar diretamente no hipotálamo aumentando a geração de neurônios, bem como a resposta do organismo a leptina, reduzindo o ganho de peso corporal. Em contrapartida, a ingestão de ácidos graxos saturados pode levar a apoptose dos neurônios hipotalâmicos resultando resistência a insulina e a leptina, perda do controle da ingestão de calorias, predispondo a obesidade (Ayala-Zavala et al., 2011; Lutterodt et al., 2011; Nascimento et al., 2016).

Em relação às safras (2012 e 2013) foi possível observar diferenças significativas na porcentagem de alguns ácidos graxos (Tabela 1). Comportamento similar foi relatado por Salvador, Rocha, and Silvestre (2015) para frutos de sabugueiro (*Sambucus nigra* L.), onde os maiores teores de ácidos graxos foram relatados para os frutos pertencentes à safra de 2013. Estas diferenças devem-se não apenas a um fator, mas como resultado de uma complexa rede de fatores, como às condições edafoclimáticas (diferentes níveis de radiação, temperatura, água, exposição ao vento, entre outros).

Os ésteres metílicos das amostras analisadas por GC-FID foram injetados no GC/MS para confirmação da identidade dos mesmos. Os espectros foram comparados com o espectro de massas do padrão correspondente.

Comparando-se com os dados da biblioteca NIST e com similaridade acima de 80%, outros ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados somente no GC/MS como, por exemplo, os ácidos pentadecanóico (C15:0), nonadecanóico (C19:0), hencosanóico (C21:0) e o tricosanóico (C23:0), todos presentes em concentrações abaixo do limite de detecção do GC-FID.

3.2 Tocoferóis

Foram avaliados intervalos de linearidade para o α -tocoferol e γ -tocoferol quantificados na semente e cada uma das regressões foi submetida a análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$) e nenhuma das regressões apresentaram falta de ajuste (ANOVA, $p > 0,05$). A precisão do método apresentou um coeficiente de variação inferior a 3,9%, mostrando boa repetibilidade do método proposto. Os limites de detecção e quantificação foram relativamente pequenos, mostrando a aplicabilidade do método. O resultado da reavaliação do método pode ser visto na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros de validação determinados para o α -tocoferol e γ -tocoferol quantificados na semente de atemóia.

Tocoferóis	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Precisão (n=10)	Equação	R ²	Falta de ajuste
α -Tocoferol	22	44	3,86	$y=1,73x -5,73$	0,99	0,06
γ -Tocoferol	27	54	2,40	$y=0,30x -0,46$	0,99	0,13

R² = coeficiente de determinação

Dos quatro isômeros de tocoferóis (α , β , γ e δ -tocoferol) avaliados, apenas o α e o γ -tocoferol foram encontrados na semente da atemóia (Tabela 3). Estudos demonstram que o α -tocoferol é o homólogo da vitamina E mais ativo nos seres humanos, sendo grande responsável pela atividade biológica (Karmowski et al., 2015; Naczki & Shahidi, 2004), enquanto que Schmidt & Pokorny (2005) relataram que o γ e δ -tocoferol possuem a maior atividade antioxidante.

Tabela 3: Concentração de tocoferóis presentes na semente liofilizada da atemóia

Safras	Teor (mg.kg ⁻¹ de óleo)	
	α -tocoferol	γ -tocoferol
2012	19,69±0,63 ^{aB}	93,38±6,9 ^{aA}
2013	18,21±0,92 ^{aB}	87,54±5,69 ^{aA}

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não representa diferença significativa entre si a $p < 0.05$ pelo teste de Tukey, $n=3$.

Nota-se, através dos dados apresentados na Tabela 3, que o isômero mais significativo identificado na semente da atemóia, independente da safra analisada, foi o γ -tocoferol, fato concordante com Masson et al. (2008) para semente da cherimóia (*Annona cherimola*) e com Luzia, Jorge (2013) para a semente do Araticum (*Annona crassiflora*). No entanto, García-Salas et al. (2016) estudando a composição lipídica de diferentes cultivares de cherimóia identificaram somente o α -tocoferol e o δ -tocoferol. O teor médio do γ -tocoferol relatado nesse trabalho foi de 90 mg kg⁻¹, valor superior ao encontrado em comparação a outras sementes de frutas das anonáceas como a fruta do conde (11,84 mg kg⁻¹) e a graviola (24,98mg kg⁻¹) (Luzia & Jorge, 2013), porém inferior ao relatado para a semente de araticum (123, 4 mg kg⁻¹) (Luzia & Jorge, 2013).

A concentração média do α -tocoferol na semente da atemóia foi de 19 mg kg⁻¹, não diferindo estatisticamente ($p > 0,05$) em relação às safras analisadas (Tabela 3). A semente de atemóia apresentou maiores concentrações em relação à semente da graviola (4,17mg Kg⁻¹), semente da fruta do conde (7,3 mg Kg⁻¹), semente da cherimóia (11mg Kg⁻¹) e a semente do araticum (12 mg Kg⁻¹) (Albuquerque et al., 2016; Luzia & Jorge, 2013). No entanto, Garcia-Salas et al. (2016) obtiveram valores de 17,4 e 26,7 mg Kg⁻¹ para a semente de cherimóia cultivar Campa e fino de Jete, respectivamente.

Quantidades similares de α -tocoferol também foram relatadas para outras sementes provenientes de resíduos agroindustriais como a uva (11,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ de óleo), melão (20,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ de óleo) e graviola (22,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ de óleo) segundo (da Silva & Jorge, 2014).

Da silva et al. (2014) avaliando os tocoferóis em sementes de frutas provenientes de resíduos agroindustriais verificaram que estas apresentaram quantidades significativas de α -tocoferol para a uva (11,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ de óleo), goiaba (45,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ de óleo), melão (20,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ de óleo) e graviola (22,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ de óleo), no entanto, estas concentrações foram menores quando comparadas com a semente de atemóia.

4. CONCLUSÃO

A composição de ácidos graxos no óleo da semente de atemóia apresentou quantidades significativas de ácidos graxos insaturados (aproximadamente 80%), com a predominância do ácido oléico e do ácido linoléico. Com relação aos tocoferóis, o α -tocoferol e o γ -tocoferol mostraram-se bastante promissores, já que as concentrações obtidas nesse trabalho foram superiores quando comparadas a sementes de outras frutas. Os resultados desse estudo demonstram que a semente da atemóia é uma importante fonte de compostos bioativos, os quais poderiam ser explorados por indústrias alimentares e farmacêuticas, além de atrair a atenção de indústrias de processamento de alimentos, de modo a direcionar melhor os seus resíduos.

5. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Albuquerque, T. G., Santos, F., Sanches-Silva, A., Beatriz Oliveira, M., Bento, A. C., & Costa, H. S. (2016). Nutritional and phytochemical composition of *Annona cherimola* Mill. fruits and by-products: Potential health benefits. *Food Chemistry*, *193*, 187-195.
- Ayala-Zavala, J. F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodriguez, J. A., Siddiqui, M. W., González-Aguilar, G. A. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, *44*(7), 1866-1874.
- Ballus, C. A., Meinhart, A. D., de Souza Campos Jr, F. A., da Silva, L. F. d. O., de Oliveira, A. F., & Godoy, H. T. (2014). A quantitative study on the phenolic compound, tocopherol and fatty acid contents of monovarietal virgin olive oils produced in the southeast region of Brazil. *Food Research International*, *62*, 74-83.
- Binkoski, A. E., Kris-Etherton, P. M., Wilson, T. A., Mountain, M. L., & Nicolosi, R. J. (2005). Balance of Unsaturated Fatty Acids Is Important to a Cholesterol-Lowering Diet: Comparison of Mid-Oleic Sunflower Oil and Olive Oil on Cardiovascular

- Disease Risk Factors. *Journal of the American Dietetic Association*, 105(7), 1080-1086.
- Cruz, L. S. d., Lima, R. Z., Abreu, C. M. P. d., Corrêa, A. D., & Pinto, L. d. M. A. (2013). Caracterização física e química das frações do fruto atemoia Gefner. *Ciência Rural*, 43, 2280-2284.
- da Silva, A. C., & Jorge, N. (2014). Bioactive compounds of the lipid fractions of agro-industrial waste. *Food Research International*, 66, 493-500.
- Dunford, N. T. (2001). Health benefits and processing of lipid-based nutritionals. [Article]. *Food Technology*, 55(11), 38.
- Elmadfa, & Wagner. (2003). Non-Nutritive Bioactive Food Constituents of Plants: Tocopherols (Vitamin E). *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 73(2), 89-94.
- Fadavi, A., Barzegar, M., & Hossein Azizi, M. (2006). Determination of fatty acids and total lipid content in oilseed of 25 pomegranates varieties grown in Iran. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 676-680.
- García-Salas, P., Verardo, V., Gori, A., Caboni, M. F., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2016). Determination of lipid composition of the two principal cherimoya cultivars grown in Andalusian Region. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 390-397.
- Karmowski, J., Hintze, V., Kschonsek, J., Killenberg, M., & Böhm, V. (2015). Antioxidant activities of tocopherols/tocotrienols and lipophilic antioxidant capacity of wheat, vegetable oils, milk and milk cream by using photochemiluminescence. *Food Chemistry*, 175, 593-600.
- Liu, T.-T., Chao, L. K.-P., Peng, C.-W., & Yang, T.-S. (2016). Effects of processing methods on composition and functionality of volatile components isolated from immature fruits of atemoya. *Food Chemistry*, 202, 176-183.
- Lutterodt, H., Slavin, M., Whent, M., Turner, E., & Yu, L. (2011). Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. *Food Chemistry*, 128(2), 391-399.
- Luzia, D. M. M., & Jorge, N. (2013). Bioactive substance contents and antioxidant capacity of the lipid fraction of *Annona crassiflora* Mart. seeds. *Industrial Crops and Products*, 42, 231-235.
- Masson, L., Camilo, C., Gonzalez, K., Caceres, A., Jorge, N., & Torija, E. M. (2008). New sources of oilseeds from Latin American native fruits. [Article]. *Natural Product Communications*, 3(3), 357-362.
- Naczki, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 95-111.

- Nascimento, L. F. R., Souza, G. F. P., Morari, J., Barbosa, G. O., Solon, C., Moura, R. F., . . . Velloso, L. A. (2016). n-3 Fatty Acids Induce Neurogenesis of Predominantly POMC-Expressing Cells in the Hypothalamus. *Diabetes*, 65(3), 673-686.
- Pino, J. A. (2010). Annona Fruits *Handbook of Fruit and Vegetable Flavors* (pp. 229-246): John Wiley & Sons, Inc.
- Rana, V. S. (2015). Fatty Oil and Fatty Acid Composition of *Annona squamosa* Linn. Seed Kernels. *International Journal of Fruit Science*, 15(1), 79-84.
- Salvador, Â. C., Rocha, S. M., & Silvestre, A. J. D. (2015). Lipophilic phytochemicals from elderberries (*Sambucus nigra* L.): Influence of ripening, cultivar and season. *Industrial Crops and Products*, 71, 15-23.
- Schieber, A., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds — recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12(11), 401-413.
- Seffrin, R. d. C., Shikano, I., Akhtar, Y., & Isman, M. B. (2010). Effects of crude seed extracts of *Annona atemoya* and *Annona squamosa* L. against the cabbage looper, *Trichoplusia ni* in the laboratory and greenhouse. *Crop Protection*, 29(1), 20-24.
- Silva, A. C., & Jorge, N. (2014). Bioactive compounds of the lipid fractions of agro-industrial waste. *Food Research International*, 66, 493-500.
- Szymańska, R., & Kruk, J. (2008). Tocopherol content and isomers' composition in selected plant species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(1), 29-33.
- Villaverde, J. J., Oliveira, L., Vilela, C., Domingues, R. M., Freitas, N., Cordeiro, N., . . . Silvestre, A. J. D. (2013). High valuable compounds from the unripe peel of several *Musa* species cultivated in Madeira Island (Portugal). *Industrial Crops and Products*, 42, 507-512.

DISCUSSÃO GERAL

O estudo dos compostos bioativos tem mostrado ser de grande interesse da comunidade científica, e também da população em geral, em virtude de suas propriedades benéficas à saúde. Neste aspecto, as frutas se destacam, pois são amplamente consumidas por suas características organolépticas e por apresentarem em sua composição compostos biologicamente ativos (MCLAUGHLIN, 2008; JIMENEZ et al., 2014). Os compostos fenólicos estão entre os compostos bioativos que mais se destacam nas frutas, além das vitaminas, dos minerais e dos ácidos graxos.

Entre as frutas, a Atemóia vem despertando interesse por ser uma fruta com alto potencial de mercado e adaptação climática intermediária (LIU et al., 2015). A principal forma de consumo é *in natura*, mas pode ser processada na forma de purês, sucos e outros produtos. Durante o processamento uma grande quantidade de subprodutos e resíduos é gerado, que se não for tratada de forma devida, pode gerar um rompimento da sustentabilidade no ciclo de produção da fruta. O estudo do aproveitamento desses subprodutos passa, obrigatoriamente, pelo conhecimento das características físico-química do material e dos compostos com propriedades bioativas (SILVA, JORGE, 2014).

Neste trabalho, as condições de extração dos compostos fenólicos da polpa e dos subprodutos (casca e semente) foram otimizadas por meio de técnicas multivariadas, utilizando como solventes água, etanol e metanol, e suas respectivas combinações (LOPES et al., 2011; HANDA et al., 2016). A melhor condição de extração para a polpa e casca da Atemóia foi uma mistura de etanol e água (70:30, v/v), enquanto que para a semente foi metanol e etanol (50:50, v/v).

Utilizando o método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999) o teor dos compostos fenólicos totais (CFT) do extrato da casca apresentou as maiores concentrações, variando de 73 mg EAG/g p.s (safra 2012) a 111 mg EAG/g p.s (safra 2013), enquanto a semente apresentou as menores concentrações (3,9 mg EAG/g p.s), já para o extrato da polpa o teor médio CFT foi de 22 mg EAG/g p.s, valor superior quando comparado a outras frutas, tais como, abacaxi (9,9 mg EAG/g p.s), goiaba (17,23 mg EAG/g p.s), maracujá (7,6 mg EAG/g p.s), mamão (12,6 mg EAG/g p.s), manga (6,5 mg EAG/g p.s), sapoti (2,9 mg EAG/g p.s) e tamarindo (9,2 mg EAG/g p.s) (DA SILVA, et al., 2014). Já em relação às safras estudadas, os frutos colhidos em Junho de 2013 apresentaram os maiores teores de compostos bioativos em relação à safra de 2012 (colhida em Setembro), essa variação deve-se as condições climáticas diversificadas,

onde o ano de 2012 foi marcado por uma insolação média diária total maior, uma quantidade de chuva maior e temperaturas máximas e mínimas superiores em relação a 2013 (INMET).

Duas, das várias funções bastante citadas dos compostos fenólicos, a capacidade antioxidante e a atividade antimicrobiana também foram avaliadas nas diferentes partes da aтемóia. Para a determinação da capacidade antioxidante utilizou-se dois métodos (ABTS e ORAC), por serem ensaios químicos *in vitro* que apresentam mecanismos distintos (RUFINO et al., 2010; PAZ et al., 2015). De maneira geral, os valores obtidos pelo método de ORAC foram maiores quando comparados ao ABTS e a casca apresentou os maiores teores com relação à polpa e semente da fruta. Observam-se uma correlação direta entre os valores obtidos para os fenólicos totais e a capacidade antioxidante, sendo esta correlação também observada para diversas matrizes (KAUR, KAAPOR, 2002; ABIDILLE et al., 2005).

A atividade antimicrobiana foi determinada pela concentração inibitória mínima (MIC) dos extratos contra alguns micro-organismos (*Bacillus cereus* CCT 2576, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Pseudomonas aeruginosa* 13388 e *Candida albicans* CCT 0776) e os resultados de inibição foram comparados segundo Duarte et al., 2005. Nesse sentido, os extratos da casca apresentaram um eficiente controle do *B. cereus* e inibiram o crescimento da *E. coli* e *S. aureus*, o extrato da polpa inibiu o crescimento do *B. cereus* e *E. coli*, enquanto que a semente não apresentou qualquer atividade antimicrobiana. Pesquisas tem relacionado a atividade antimicrobiana de fontes naturais com a presença de compostos bioativos, principalmente aos compostos fenólicos (MAIER et al., 2009).

Vale ressaltar que os compostos fenólicos na forma livre representam a menor fração, enquanto que a maior parte destes encontra-se na forma de complexos ligados a polímeros da parede celular (carboidratos e proteínas) dos vegetais, por meio de ligação éster e glicosídicas. Grande parte dos trabalhos expressa apenas os compostos fenólicos livres, no entanto, nos últimos anos tem aumentado o número de publicações destacando a importância de se identificar os compostos ligados (CHEN & ZUO, 2007; AHMAD et al., 2016). Em vista disso, o emprego de processos de hidrólise (ácida, básica ou enzimática), tem sido utilizado (IGNAT et al., 2011; AHMAD et al., 2016). Nesse estudo, foram determinados os compostos fenólicos livres e após a hidrólise os fenólicos totais presentes, já que algumas das condições da hidrólise podem levar a degradação parcial e até total de alguns fenólicos livres (MOUSSA-AYOUB et al., 2011; TAROLA et al., 2013).

Após a extração, a identificação e quantificação dos compostos fenólicos foram realizadas através da técnica de separação por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas, utilizando como fonte de ionização o eletrospray (ESI) e um triplo quadrupolo como analisador no modo de monitoramento seletivo de reações (SRM), o que torna o método adequado, por exibir características como seletividade e especificidade.

Entre os quinze compostos analisados pelo método proposto (ácidos gálico, vanílico, cafeico, siríngico, sinápico, ferúlico, clorogênico, *p*-coumárico e 3.4-dihidroxibenzoico, e catequina, epicatequina, quercetina, kampferol, apigenina e rutina), os extratos da atemóia apresentaram nove compostos fenólicos. Na forma livre, a epicatequina foi o composto majoritário encontrado na casca (teor médio 713 $\mu\text{g/g}_{\text{p.s}}$) e na polpa (teor médio 84 $\mu\text{g/g}_{\text{p.s}}$), seguido da catequina que apresentou 275 $\mu\text{g/g}_{\text{p.s}}$ e 31.8 $\mu\text{g/g}_{\text{p.s}}$ para a casca e polpa, respectivamente. A rutina também foi quantificada na polpa e nos subprodutos, porém em baixas concentrações. O ácido clorogênico foi detectado na casca, mesmo em teor abaixo do limite de quantificação da metodologia. Já no extrato hidrolizado, os fenólicos encontrados foram os ácidos 3.4-dihidroxibenzoico, vanílico, *p*-coumárico e ferúlico (não encontrados na forma livre), sendo as maiores concentrações observadas para a casca da fruta, seguido da polpa e com baixas concentrações para a semente. Todos os fenólicos detectados na forma livre não foram observados no extrato hidrolizado, o que corrobora dados da literatura sobre a labilidade dos compostos fenólicos frente às condições de hidrólise (MOUSSA-AYOUB et al., 2011; TAROLA et al., 2013).

Outras frutas da família das *Annonaceae*, como a graviola, fruta do conde, biribá e paw paw já foram objetos de estudo de alguns pesquisadores (CHATROU et al., 2012; LUSTOSA et al., 2012). A graviola, por exemplo, está incluída no Programa de Nutrição Brasileira e tem sido recomendada para hidratação oral (> 70% de umidade) e como fonte de potássio (ENWEAIN et al., 2004) e, assim como o paw paw, tem sido utilizada na medicina popular para tratamento de câncer. Estudos epidemiológicos apontam que diferentes partes da planta e das frutas da família das *Annonaceae* apresentam propriedades anticancerígenas (CHEN et al., 2012; HAMIZAH et al., 2012), em virtude da presença, principalmente dos polifenóis (LAMPERI et al., 2008). Além dos polifenóis, os minerais (importantes eletrólitos) também são constituintes fundamentais, auxiliando na manutenção de funções no organismo humano (SPAZIANI et al., 2006). Visto que existem diferentes técnicas de determinação desses dois compostos importantes (fenólicos e minerais), para uma comparação direta

atemóia e outras frutas da família da *Annonaceae* (graviola, fruta do conde, paw paw e biriba), essas determinações foram realizadas em estudo conjunto com outros pesquisadores. Em primeiro lugar foi estabelecido um protocolo único de extração dos compostos fenólicos, que consistiu numa extração acelerada por solvente, utilizando metanol a uma temperatura de 100 °C e pressão de 10,3 MPa, por 3 min, repetindo-se a operação por mais três vezes. Os compostos fenólicos foram determinados utilizando o mesmo método empregado para a atemóia anteriormente e os minerais utilizando a técnica de ICP OES.

Na comparação entre as frutas analisadas, a graviola apresentou as maiores concentrações dos ácidos *p*-coumárico (62,6 µg/g_{s.s}), 3.4-dihidroxibenzoico (16,5 µg/g_{s.s}) e caféico (7,75 µg/g_{s.s}), enquanto que a atemóia demonstrou os maiores teores de epicatequina (211 µg/g_{s.s}) e catequina (38,6 µg/g_{s.s}), já o paw paw se destacou com relação ao ácido clorogênico (48,1 µg/g_{s.s}). Em comparação com o método de extração e análise dos compostos fenólicos (livres e conjugados) para a atemóia, conduzidos anteriormente, pode-se observar uma composição bastante distinta. Utilizando a extração acelerada por solvente (AES) verificou-se uma hidrólise parcial dos compostos, visto a menor concentração dos ácidos 3.4-dihidroxibenzoico, vanílico e *p*-coumárico, além da ausência da quercetina e do ácido ferúlico, quando comparados ao extrato hidrolizado (com HCl), assim como as elevadas concentrações de catequina e epicatequina que provavelmente não foram degradadas devido as condições mais brandas para o método AES.

Com relação aos elementos minerais, as frutas estudadas apresentaram níveis relativamente elevados de potássio (7640-15000 µg/g_{s.s}), sendo que a atemóia apresentou as maiores concentrações e as menores quantidades foram observadas para o paw paw. Para os demais elementos presentes nas cinco frutas analisadas, a concentração variou na faixa de: cálcio (547-1110 µg/g_{s.s}), sódio (14,3-123 µg/g_{s.s}), magnésio (472-980 µg/g_{s.s}), manganês (1,86-5,27 µg/g_{s.s}), zinco (5,55-7,32 µg/g_{s.s}), ferro (7,4-12,3 µg/g_{s.s}), cobre (1,6-6,2 µg/g_{s.s}) e cromo (0.13-0.58 µg/g_{s.s}). Levando-se em consideração uma porção de 300g (peso médio da maioria das frutas das *Annonaceae*), as frutas aqui analisadas podem ser consideradas fontes de cobre (15% a 65% da ingestão diária recomendada (IDR)) e de potássio (10% a 19% da IDR). Para o magnésio, ferro e fósforo a IDR permaneceu entre 4% a 17%.

Com relação à fração lipídica, a investigação de óleos especiais provenientes de frutas e de seus subprodutos é um campo de pesquisa emergente, ainda pouco explorado. Por conta da presença de compostos bioativos que desempenham um fator preventivo em várias doenças cardiovasculares e degenerativas, o estudo destas frações lipídicas tem sido foco de

diversas pesquisas nos últimos anos (SILVA & JORGE, 2014; VILLAVERDE et al., 2013). Nesse sentido, para a semente da atemóia foram realizadas a determinação do perfil dos ácidos graxos, obtido através do GC-FID e a confirmação dos mesmos por GC/MS e a análise dos tocoferóis através do HPLC com detector de fluorescência. Os resultados obtidos demonstraram que a composição de ácidos graxos na semente da atemóia apresentou quantidades significativas de ácidos graxos insaturados (aproximadamente 80%), com a predominância do ácido oléico (43%) e do ácido linoléico (34%), seguido dos ácidos graxos saturados, sendo representada principalmente pelo ácido palmítico (13,5%) e esteárico (6,0%), composição similar foi encontrada por Rana (2014) para as sementes da fruta do conde. Com relação aos tocoferóis, foi quantificado α - tocoferol (24 mg/Kg_{óleo}) e o γ -tocoferol (90,5 mg/Kg_{óleo}), fato concordante com Masson et al. (2008) para as sementes de cherimóia, demonstrando que a semente da atemóia pode ser uma fonte desses compostos bioativos.

CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho ampliou os conhecimentos científicos da aтемóia, principalmente com relação aos compostos fenólicos e as propriedades funcionais (capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana), além dos minerais, tocoferóis e ácidos graxos, os quais são escassos na literatura.

Além destes dados que podem promover o consumo da fruta, a produção da mesma também pode ser incentivada pela possibilidade da utilização de seus subprodutos (casca e semente) que apresentaram quantidades significativas de compostos bioativos e importantes propriedades funcionais, com destaque para a casca da fruta, contribuindo para a redução dos custos de produção.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABIDILLE, M. D. H.; SINGH, R. P.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JENA, B. S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, Washington, v. 90, p. 891-896, 2005.

AHMAD, N.; ZUO, Y.; LU, X.; ANWAR, F.; HAMEED, S. Characterization of free and conjugated phenolic compounds in fruits of selected wild plants. **Food Chemistry**, v. 190, p. 80-89, 2016.

CHATROU, L. W.; PIRIE, M. D.; ERKENS, R. H. J.; COUVREUR, T. L. P.; NEUBIG, K. M.; ABBOTT, J. R.; MOLS, J. B.; MAAS, J.W.; SAUNDERS, R. M. K.; CHASE, M.W. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, 5–40, 2012.

CHEN, H.; ZUO, Y. Identification of flavonol glycosides in American cranberry fruit. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1357–1364, 2007.

DA SILVA, et al. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 143, p. 398-404, 2014.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305–311, 2005.

ENWEANI, I. B.; OBROKU, J.; ENAHORO, T.; OMOIFO, C. The biochemical analysis of soursop (*Annona muricata* L.) and sweetsop (*A.squamosa* L.) and their potential use as oral rehydration therapy. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 2, p. 39-43, 2004.

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

HANDA, C. L.; De LIMA, F. S.; GUELFY, M. F.G. et al. Multi-response optimisation of the extraction solvent system for phenolics and antioxidant activities from fermented soy flour using a simplex-centroid design. **Food Chemistry**, v. 197, p. 175-184, 2016.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v.126, p.1821–1835, 2011.

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

KAUR, C.; KAPOOR, H.C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **Jounal of Food Science Technology**, Oxford, v.37, p.153-161, 2002.

LAMPERI, L.; CHIUMINATTO, U.; CINCINELLI, A.; GALVAN, P.; GIORDANI, E.; LEPRI, L.; DEL BUBBA, M. Polyphenol levels and free radical scavenging activities of four apple cultivars from integrated and organic farming in different Italian areas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 6536–6546, 2008.

LIU, K. D.; LI, H. L.; YUAN, C. C.; HUANG, Y. L. ; CHEN, Y. ; LIU, J. X. Identification of phenological growth stages of sugar apple (*Annona squamosa* L.) using the extended BBCH-scale. **Scientia Horticulturae**, v. 181, p. 76–80, 2015.

LUSTOSA, M.M.; BARROSO, C. B.; VAREDA, T. F.; CARVALHO, N. P. Comparative analysis of fruit and vegetable consumption in a food service unit: Is it possible to influence the choices? **The Natural Products Journal**, v. 2, p. 161-163, 2012.

MAIER, T.; SCHIEBER, A.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 112, p. 551-559, 2009.

MASSON, L.; CAMILO, C., GONZALEZ, K.; CACERES, A.; JORGE, N.; TORIJA, E. N. New sources of oilseeds from Latin American native fruits. **Natural Product Communications**, v. 3, p. 357-362, 2008.

MOUSSA-AYOUB, T. E.; EL-SAMAHY, S. K.; KROH, L.W.; ROHN, S. Identification and quantification of flavonol aglycons in cactus pear (*Opuntia ficus indica*) fruit using a commercial pectinase and cellulase preparation. **Food Chemistry**, v. 124, p.1177-1184, 2011.

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

PAZ, M.; GÚLLON P.; BARROSO, M. F.; CARVALHO, A. P.; DOMINGUES, V. F.; GOMES, A. M.; BECKER, H.; LONGHINOTTI, E.; DELERUE-MATOS, C. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: evaluation of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 172, p. 462-468, 2015.

RANA, S. V. Fatty Oil and Fatty Acid Composition of *Annona squamosa* Linn. Seed Kernels. **International Journal of Fruit Science**, v. 15, p. 79-84, 2015.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p.996-1002, 2010.

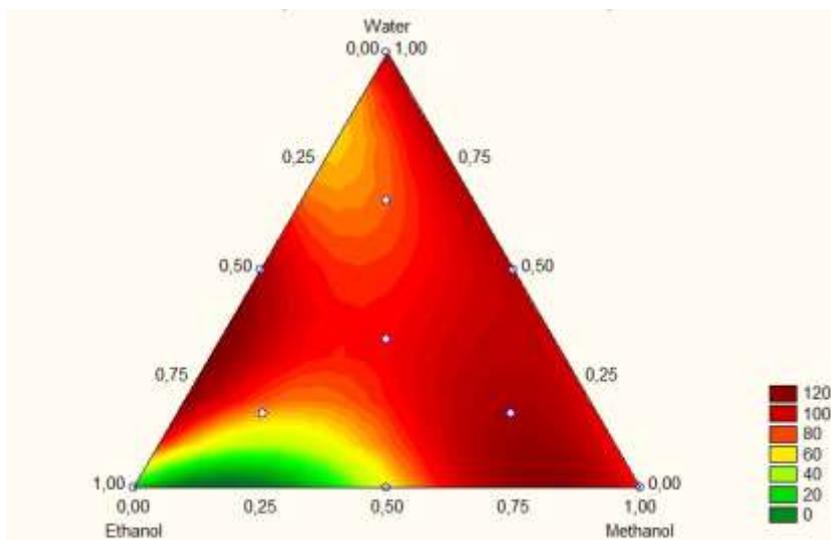
SILVA, A. C.; JORGE, N. Bioactive compounds of the lipid fractions of agro-industrial waste. **Food Research International**, v. 66, p. 493-500, 2014.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, **Methods of Enzymology**, New York, v. 299, p. 152-178, 1999.

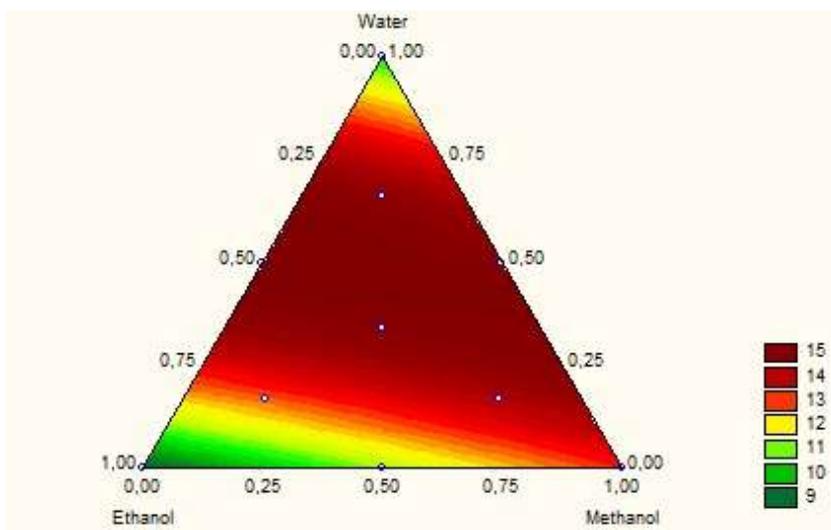
VILLAVERDE, J. J.; OLIVEIRA, L.; VILELA, C.; DOMINGUES, R. M.; FREITAS, N. et al. High valuable compounds from the unripe peel of several *Musa* species cultivated in Madeira Island (Portugal). **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 507-512, 2013.

TAROLA, A. M.; VELDE, F. V.; SALVAGNI, L.; PRETI, R. Determination os phenolic compounds in strawberries (*Fragaria ananassa* Duch) by high performance liquid chromatography with diode array detection. **Food Analytical Methods**, v. 6, p. 227-237, 2013.

APÊNDICES



Apêndice 1: Superfície de resposta para o modelo cúbico completo da casca da atemóia



Apêndice 2: Superfície de resposta para o modelo quadrático da polpa da atemóia

Apêndice 3: Cromatogramas obtidos através do monitoramento seletivo de reações (SRM).