



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA)

BEATRIZ ROCCHETTI SUMERE

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS A PARTIR DA CASCA DE ROMÃ  
(*PUNICA GRANATUM* L.) UTILIZANDO ULTRASSOM E LÍQUIDOS  
PRESSURIZADOS E AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOLÓGICO DOS EXTRATOS EM  
CÉLULAS TUMORAIS DE MONÓCITOS HUMANOS (THP-1)

LIMEIRA

2018

BEATRIZ ROCCHETTI SUMERE

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS A PARTIR DA CASCA DE ROMÃ  
(*PUNICA GRANATUM* L.) UTILIZANDO ULTRASSOM E LÍQUIDOS  
PRESSURIZADOS E AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOLÓGICO DOS EXTRATOS EM  
CÉLULAS TUMORAIS DE MONÓCITOS HUMANOS (THP-1)

*Dissertação apresentada à  
Faculdade de Ciências Aplicadas /  
Instituto da Universidade Estadual  
de Campinas como parte dos  
requisitos exigidos para a obtenção  
do título de Mestra em Ciências da  
Nutrição e do Esporte e  
Metabolismo na Área de Nutrição.*

*Orientador:* DR. MAURICIO ARIEL ROSTAGNO

*Co-orientadora:* DR<sup>a</sup>. ROSÂNGELA MARIA NEVES BEZERRA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL  
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA  
BEATRIZ ROCCHETTI SUMERE, E ORIENTADA PELO  
PROF. DR. MAURICIO ARIEL ROSTAGNO

LIMEIRA  
2018

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas  
Renata Eleuterio da Silva - CRB 8/9281

Su62e Sumere, Beatriz Rocchetti, 1990-  
Extração de compostos bioativos a partir da casca de romã (*Punica granatum* L.) utilizando ultrassom e líquidos pressurizados e avaliação do efeito biológico dos extratos em células tumorais de monócitos humanos (THP-1) / Beatriz Rocchetti Sumere. – Limeira, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Mauricio Ariel Rostagno.  
Coorientador: Rosângela Maria Neves Bezerra.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Romã. 2. Compostos fenólicos. 3. Extração com líquido pressurizado. 4. Ultrassom. I. Rostagno, Mauricio Ariel, 1974-. II. Bezerra, Rosângela Maria Neves, 1957-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Extraction of bioactive compounds from pomegranate peel (*Punica granatum* L.) using ultrasound and pressurized liquids and evaluation of the biological effect of extracts in human monocytes tumor cells (THP-1)

**Palavras-chave em inglês:**

Pomegranate  
Phenolic compounds  
Extraction with pressurized liquid  
Ultrasound

**Área de concentração:** Nutrição

**Titulação:** Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

**Banca examinadora:**

Mauricio Ariel Rostagno [Orientador]  
Gerardo Fernández Barbero  
Fernando Simabuco

**Data de defesa:** 12-07-2018

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

**Autor:** Beatriz Rocchetti Sumere

**Título:** Extração de compostos bioativos a partir da casca de romã (*Punica granatum* L.) utilizando ultrassom e líquidos pressurizados e avaliação do efeito biológico dos extratos em células tumorais de monócitos humanos (THP-1)

**Natureza:** Trabalho de conclusão do Mestrado no CNEM (Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo)

**Instituição:** Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas

**Aprovado em:** 12/07/2018

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Mauricio Ariel Rostagno (orientador)  
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

---

Prof. Dr. Gerardo Fernández Barbero (Avaliador)  
Faculdade de Ciências da Universidade de Cádiz (UCA)

---

Prof. Dr. Fernando Moreira Simabuco (Avaliador)  
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno

*“Ninguém ignora tudo.  
Ninguém sabe tudo.  
Todos nós sabemos alguma coisa.  
Todos nós ignoramos alguma coisa.  
Por isso aprendemos sempre.”*

- Paulo Freire

## **AGRADECIMENTOS**

Meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que colaboraram para que o meu Mestrado na Unicamp fosse possível e que, direta ou indiretamente, contribuíram na elaboração deste trabalho.

Aos meus pais, João e Joseli, que me aconselham, apoiam e me ajudam em tudo o que preciso. Aos meus irmãos, João e Gabriel, que me acompanham e torcem pela minha felicidade. Ao meu namorado e amigo, Augusto Rocha, que me inspira a fazer um bom trabalho e me motiva a sorrir mais todos os dias. Aos familiares e amigos que comemoram as minhas conquistas.

Ao meu professor orientador, Dr. Mauricio Rostagno, que confiou no meu trabalho, teve paciência e prontidão em me ensinar e ajudar, que me tratou com respeito e empatia. À minha professora co-orientadora, Dra. Rosângela Bezerra, com quem compartilhei muitas dúvidas, me ouviu e me aconselhou.

Aos professores titulares da banca de defesa, Dr. Gerardo Fernández Barbero e Dr. Fernando Moreira Simabuco, e as professoras suplentes, Dr<sup>a</sup>. Caroline Dario Capitani e Dr<sup>a</sup>. Priscilla Carvalho Veggi, por dedicarem esforços e tempo na correção da minha dissertação e pela disposição em estarem presentes nesse dia tão importante da minha vida.

As minhas companheiras de trabalho, Camila Telles, Mariana Corrêa e Mariana Pacífico, que me ajudaram a fazer as pesquisas, compartilharam histórias e sentimentos, tornando os meus dias mais divertidos e especiais. À minha amiga, Isabela Lorzola, que me indicou e me incentivou fazer o mestrado.

A todos os professores e alunos do LAFAL (Laboratório de Propriedades Funcionais em Alimentos) pela troca de conhecimento. Ao professor Dr. Diogo Thimoteo da Cunha, pela ajuda com os cálculos estatísticos. À aluna de iniciação científica Thaís Almeida por me ensinar e ajudar a fazer determinadas análises no laboratório.

À aluna Letícia Tamborlim e ao professor Dr. Augusto Luchessi pela parceria no laboratório LABGEN (Laboratório de Genômica Nutricional). Às alunas Ana Paula Machado, Carolina Mekaru e ao professor Dr. Julian Martínez pela parceria no

laboratório LAPEA (Laboratório de Alta Pressão em Engenharia de Alimentos) da Faculdade de Engenharia de Alimentos.

Aos membros do ESF (Engenheiros Sem Fronteiras), com os quais vivenciei histórias incríveis, que me acolheram e desenvolveram o meu senso crítico.

À UNICAMP, funcionários e professores, por tornarem possível a minha formação como Mestra.

Aos professores da UCA (Universidade de Cádiz), Dr. Dominico Guillén Sánchez e Dr. Carmelo García Barroso do departamento de Química Analítica, que aprovaram o meu intercâmbio para a Espanha. Aos professores Dr. Gerardo Fernández Barbero e Dr. Miguel Palma Lovillo, e aos técnicos de laboratório Emiliano de Miguel Gómez e Ceferino Carrera Fernandez que me ajudaram a fazer todas as pesquisas na UCA.

Aos auxílios financeiros proporcionados pelo CNPq, FAEPEX, PRPG e SANTANDER.

## RESUMO

Esta tese está dividida em três capítulos. No primeiro capítulo, foram avaliados os efeitos da temperatura (40 a 70 °C), frequência (37 e 80 kHz), modo de operação do ultrassom (normal, pulsos e sweep) assim como o efeito da interação entre tais fatores na recuperação dos compostos fenólicos presentes na casca da romã (*Punica granatum* L.) durante a Extração Assistida por Ultrassom (UAE). No segundo capítulo, foi avaliada a possibilidade de extrair compostos fenólicos combinando as técnicas UAE e Extração com Líquido Pressurizado (PLE), resultando na técnica Extração com Líquido Pressurizado Assistida por Ultrassom (UAPLE). Foi avaliada a influência do solvente (água pura [A], etanol + água 30% [B], 50% [C] e 70% [D] v:v); da temperatura (50 a 100 °C); da potência do ultrassom (0 a 800 W no gerador); do tamanho médio da partícula (0.68 e 1.05 mm) e do número de ciclos (1 a 5) no rendimento de 20 compostos fenólicos presentes nos extratos obtidos das cascas de romã por UAPLE. No terceiro capítulo, foi avaliada a bioatividade dos extratos A, B, C e D produzidos por UAPLE em células leucêmicas THP-1. Na UAE, temperaturas em torno de 50 e 70 °C, frequência de 37 kHz e modos de operação normal e pulsos, foram as condições que forneceram os melhores rendimentos de compostos fenólicos. A 60 °C, 37 kHz e modo contínuo, foram obtidos  $43.20 \pm 0.50$  mg de compostos fenólicos/g de amostra seca (bs),  $154.34 \pm 16.21$  mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/g bs de FT (fenólicos totais) e rendimento global de extrato de 59%. Na UAPLE, os melhores resultados foram obtidos com o solvente de extração água, temperaturas entre 70 e 80 °C e potência do ultrassom intermediária de 480 a 640 W. A extração com ultrassom foi um ciclo mais rápido, tanto com partículas pequenas (0.68 mm) quanto com partículas grandes (1.05 mm). Utilizando partículas grandes, as melhores condições de extração foram obtidas com solvente de extração água, temperatura de 70 °C, potência do ultrassom a 480 W e três ciclos, resultando em  $61.72 \pm 7.70$  mg de compostos fenólicos/g bs. Problemas de obstrução observados com partículas pequenas foram evitados com o uso de partículas grandes, que combinadas com ultrassom, permitiram operação consistente com boa reprodutibilidade interdia (>95%). UAPLE demonstrou ser uma alternativa limpa, eficiente e verde para a extração de compostos fenólicos das cascas de romã. Os resultados do terceiro capítulo mostram que os extratos da casca de romã têm grande potencial terapêutico e que a escolha do solvente determina os efeitos no ciclo celular e na apoptose das células leucêmicas THP-1.

**Palavras-chave:** Romã, Compostos Fenólicos, Extração com Líquidos Pressurizados, Ultrassom, Replicação do DNA, Apoptose, Células THP-1, Leucemia.

## ABSTRACT

This thesis is divided in three chapters. In the first chapter, the effects of temperature (40 to 70 °C), frequency (37 and 80 kHz), ultrasound operation mode (normal, pulses and sweep) were evaluated as well as the effect of the interaction between these factors in the recovery of the phenolic compounds present in the peel of pomegranate (*Punica granatum* L.) during the Ultrasonic Assisted Extraction (UAE). In the second chapter, the possibility of extracting phenolic compounds by combining the UAE and Pressurized Liquid Extraction (PLE) techniques, resulting in the technique of Ultrasonic Pressurized Liquid Extraction (UAPLE) was evaluated. The influence of the solvent (pure water [A], ethanol + water 30% [B], 50% [C] and 70% [D] v:v); temperature (50 to 100 °C); ultrasound power (0 to 800 W in the generator); mean particle size (0.68 and 1.05 mm), and the number of cycles (1 to 5) in the yield of 20 phenolic compounds present in the extracts obtained from the pomegranate peel by UAPLE was evaluated. In the third chapter, the bioactivity of extracts A, B, C and D produced by UAPLE in THP-1 leukemic cells was evaluated. In UAE, temperatures around 50 and 70 °C, 37 kHz frequency, normal and pulses modes of operation were the conditions that provided the best phenolic compounds yields. At 60 °C, 37 kHz and continuous mode, were provided  $43.20 \pm 0.50$  mg of phenolic compounds/g dry sample (bs),  $154.34 \pm 16.21$  mg of gallic acid equivalent (EAG)/g bs of FT (total phenolic compounds) and 59% global yield. In UAPLE, the best results were obtained with the water extraction solvent, temperatures between 70 and 80 °C and intermediate ultrasound power from 480 to 640 W. Ultrasound extraction was one cycle faster with both small particles (0.68 mm) and large particles (1.05 mm). Using large particles, the best extraction conditions were obtained with water extraction solvent, temperature of 70 °C, ultrasound power at 480 W and three cycles, resulting in  $61.72 \pm 7.70$  mg of phenolic compounds/g bs. Continuous obstruction problems observed with small particles were avoided with the use of large particles, which combined with ultrasound, allowed consistent operation with good reproducibility interday (>95%). UAPLE has been shown to be a clean, efficient and green alternative for extracting phenolic compounds from pomegranate peels. The results of the third chapter show that pomegranate peel extracts have great therapeutic potential and that the choice of the solvent determines the effects on the cell cycle and apoptosis of THP-1 leukemic cells.

**Keywords:** *Pomegranate, Phenolic Compounds, Pressurized Liquid extraction, Ultrasound, DNA replication, Apoptosis, THP-1 Cells, Leukemia.*

## LISTRA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Partes do fruto da romã .....	18
<b>Figura 2</b> - Estrutura química dos principais compostos presentes na casca de romã .....	19
<b>Figura 3</b> - Etapas do ciclo celular .....	20
<b>Figura 4</b> - Espectros de massas dos compostos fenólicos presentes nos extratos da casca de romã .....	28
<b>Figura 5</b> - Cromatogramas representativos dos padrões e extratos a 378 nm .....	34
<b>Figura 6</b> - Sistema integrado “Extract-US” .....	44
<b>Figura 7</b> - Diagrama do sistema integrado de análise Extract-US .....	45
<b>Figura 8</b> - Diagrama da célula de extração com ultrassom do sistema Extract-US .....	46
<b>Figura 9</b> - Cromatogramas representativos a 370 nm dos extratos da casca de romã usando solventes A, B, C e D .....	49
<b>Figura 10</b> - Gráfico do rendimento de extração de POCF usando diferentes temperaturas e solventes .....	51
<b>Figura 11</b> - Gráfico do rendimento de extração de POCF usando diferentes potências de ultrassom e tamanho das partículas .....	57
<b>Figura 12</b> - POCF acumulado comparando o efeito do ultrassom, o tamanho das partículas e o número de ciclos .....	60
<b>Figura 13</b> - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da casca de romã .....	63
<b>Figura 14</b> - Ciclo celular após tratamento com extratos A e D .....	73
<b>Figura 15</b> - Porcentagem de DNA fragmentado após tratamento com os extratos .....	75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Caracterização química por UHPLC-MS/MS da casca da romã .....	27
<b>Tabela 2</b> - Rendimento de extração dos compostos fenólicos presentes nos extratos da casca de romã obtidos com diferentes temperaturas, frequências e modos de operação do ultrassom .....	35
<b>Tabela 3</b> - Fenólicos totais e rendimento global de extrato obtidos da casca de romã utilizando diferentes temperaturas, frequências e modo de operação do ultrassom ...	36
<b>Tabela 4</b> - Resumo da Análise de Variância (ANOVA): significância de fontes de variabilidade nos rendimentos de extração de $\alpha$ -pun, $\beta$ -pun, AE e PCF, FT e $X_0$ .....	37
<b>Tabela 5</b> - Correlações entre FT e $X_0$ .....	41
<b>Tabela 6</b> - Rendimento de extração de compostos fenólicos de extratos da casca de romã usando diferentes solventes de extração e temperaturas por UAPLE .....	50
<b>Tabela 7</b> - Rendimento de extração de compostos fenólicos de extratos da casca de romã usando diferentes potência de ultrassom e tamanho de partícula .....	56
<b>Tabela 8</b> - Rendimento de extração de compostos fenólicos de extratos da casca de romã usando diferentes potência de ultrassom e tamanho de partícula e cinco ciclos .....	59
<b>Tabela 9</b> - Concentração (mg/L) dos compostos detectados por HPLC em extratos obtidos a partir da casca de romã usando diferentes solventes .....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

30% EtOH	Etanol em água 30% v:v
50% EtOH	Etanol em água 50% v:v
70% EtOH	Etanol em água 70% v:v
UAE	Extração Assistida por Ultrassom ( <i>Ultrasound-Assisted Extraction</i> )
PLE	Extração com Líquido Pressurizado ( <i>Pressurized Liquid Extraction</i> )
UAPLE	Extração com Líquido Pressurizado Assistida por Ultrassom ( <i>Ultrasound-Assisted Pressurized Liquid Extraction</i> )
SFE	Extração com Fluido Supercrítico ( <i>Supercritical Fluid Extraction</i> )
UASFE	Extração com Fluido Supercrítico Assistida por Ultrassom ( <i>Ultrasound-Assisted Supercritical Fluid Extraction</i> )
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
X <sub>0</sub>	Rendimento global de extrato
FT	Fenólicos Totais
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
PCF	Principais Compostos Fenólicos ( $\alpha$ -pun + $\beta$ -pun + AE-hex + AE)
OCF	Outros Compostos Fenólicos (AE-pent + AE-deox + Pedun I + compostos não identificados)
POCF	PCF + OCF

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	15
1.1. Compostos funcionais e romã .....	17
1.2. Câncer .....	19
<b>2. OBJETIVOS GERAIS</b> .....	23
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS</b> .....	24
3.1. Reagentes químicos e solventes .....	24
3.2. Tratamento das amostra .....	24
3.3. Caracterização do extratos .....	24
3.3.1. <i>Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)</i> .....	25
3.3.2. <i>Identificação dos compostos fenólicos por UHPLC-MS/MS</i> .....	26
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	29
CAPÍTULO I .....	30
1. INTRODUÇÃO .....	31
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	31
2.1. Extração assistida por ultrassom .....	31
2.2. Compostos fenólicos totais .....	32
2.3. Rendimento global de extrato .....	32
2.4. Análise estatística .....	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
3.1. Efeito da temperatura de extração .....	37
3.2. Efeito da frequência de ultrassom .....	38
3.3. Efeito do modo de operação do ultrassom .....	39
3.4. Correlação entre concentração de fenólicos e rendimento de extrato total .....	40
4. CONCLUSÕES .....	41
CAPÍTULO II .....	42
1. INTRODUÇÃO .....	43
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	43
2.1. Determinação do tamanho de partícula médio .....	43

2.2. Extração assistida por ultrassom com líquidos pressurizados .....	44
2.3. Microscopia eletrônica de varredura .....	47
2.4. Análise estatística .....	48
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	48
3.1. Efeito da temperatura de extração e solvente .....	51
3.2. Efeito da potência de ultrassom, tamanho de partícula e número de ciclos .....	52
4. CONCLUSÕES .....	64
CAPÍTULO III .....	66
1. INTRODUÇÃO .....	67
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	68
2.1. Cultura de células .....	69
2.2. Tratamento das células .....	69
2.3. Análise do DNA fragmentado e ciclo celular por citometria .....	69
2.4. Extrações por UAPLE .....	70
2.5. Análise estatística .....	70
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	70
3.1. O perfil dos compostos fenólicos extraídos foi significativamente influenciado pelo uso de diferentes solventes .....	70
3.2. Diferentes tratamentos com extratos de romã alteram a progressão do ciclo celular de células THP-1 .....	71
3.3. Os tratamentos com extratos de romã aumento a porcentagem de células THP-1 com DNA fragmentado .....	74
4. CONCLUSÕES .....	76
CONCLUSÕES GERAIS .....	77
REFERÊNCIAS .....	79

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Entre os compostos bioativos de produtos naturais, os compostos fenólicos são uma das classes mais estudadas devido à sua associação com vários efeitos positivos sobre a prevenção da saúde e doenças. Eles são encontrados em altas concentrações em várias frutas, como maçãs, uvas e romã [1]. As cascas de romã são uma fonte interessante de compostos fenólicos, uma vez que representam 38% do peso total do fruto [2] e contêm mais compostos fenólicos que as sementes de romã e a polpa, mostrando potencial para ser explorado como ingrediente funcional [3]. Vários compostos fenólicos, incluindo antocianinas, taninos hidrolisáveis e ácidos hidroxibenzoicos foram identificados em cascas de romã, onde os elagitaninos são a classe fenólica predominante e a punicalagina (HHDP-gallagyl-hexoside) é o principal composto presente [4]. Estudos demonstraram que as cascas de romã possuem propriedades anti-inflamatórias [5], podem ser utilizadas no tratamento de doenças como o câncer [6], diabetes tipo 2 [7] e doenças cardiovasculares [8][9].

No entanto, para poder utilizar os compostos fenólicos como agentes terapêuticos ou para analisar as concentrações em alimentos, é necessário removê-los da matriz de matéria-prima/amostra, através de diferentes técnicas e condições. Existe grande interesse no desenvolvimento de métodos de extração que sejam mais rápidos que os métodos convencionais atualmente conhecidos, mais baratos, ecológicos e que minimizem a degradação dos compostos alvo. Existem várias técnicas sendo estudadas que melhorem a extração de compostos bioativos de produtos naturais, entre elas, extração com líquidos pressurizados (PLE), extração assistida por ultrassom (UAE) e extração de fluido supercrítico (SFE) [1].

PLE é uma técnica de extração em que a temperatura e a pressão são usadas para acelerar a extração de compostos de amostras sólidas e semissólidas. A pressão foi relatada para ajudar a direcionar o solvente nos poros da matriz e aumentar a solubilidade do analito [10]. Uma vez que o PLE é conduzido a pressões elevadas, permite a extração líquida a temperaturas acima do ponto de ebulição do solvente à pressão atmosférica, melhorando assim a solubilidade do analito e sua desorção da matriz. Além disso, a temperatura pode modificar drasticamente a permissividade relativa do fluido de extração, aumentando sua seletividade [11]. As técnicas de solventes pressurizados também oferecem a vantagem de especificidade e velocidade de molécula de alvo melhorada devido às propriedades físico-químicas

do solvente, incluindo densidade, difusividade, viscosidade e constante dielétrica, que podem ser afetadas pela pressão e temperatura do sistema de extração [12].

PLE foi utilizada com sucesso para a extração de diferentes classes de fenólicos das amostras mais diversas, incluindo juçara [13], mirtilo [14], grãos de arroz [15] e folhas de bambu negro [16]. Também foi usada para a extração de fenólicos da casca de batata [17], romã [18][19], amora [20] e jaboticaba [21]. Em geral, PLE fornece excelentes resultados para a extração de fenólicos presentes em fontes vegetais.

Outra técnica de extração, UAE, é baseada na formação de ondas ultrassônicas longitudinais capazes de causar o fenômeno da cavitação devido à formação de regiões de expansão e compressão. O acúmulo de energia devido aos ciclos de compressão e expansão causa o colapso das bolhas de gás e a onda de choque resultante passa através do solvente, exercendo um efeito mecânico que facilita sua penetração e afeta as paredes celulares da matriz, resultando na liberação de grandes quantidades de conteúdo intracelular ao meio de extração [1][22]. Existem estudos que relacionam UAE com a extração de compostos fenólicos da casca de romã [23], soja [24], mirtilo [25] e amora [26]. A maioria dos estudos afirma que UAE foi capaz de acelerar a extração de compostos fenólicos das amostras, quando comparada com técnicas convencionais.

PLE e UAE são alternativas às técnicas convencionais e podem aumentar a eficiência da extração, contribuindo para a preservação ambiental, reduzindo o uso de solventes orgânicos ou substituindo-os por solventes “verdes”, como a água. Essas técnicas inovadoras também são consideradas técnicas de extração “verdes” porque podem reduzir a energia consumida no processo, gerando menores impactos ambientais [27].

Além disso, uma característica interessante da UAE é a possibilidade de combiná-la com outras técnicas, como micro-ondas, extração por fase sólida e SFE [28]. Estudos sugerem um efeito positivo da combinação de UAE com SFE em termos de seletividade e rendimento nas extrações de compostos antioxidantes da amora [22] e capsaicina de pimenta [29]. Tais efeitos podem estar relacionados com o aumento da transferência de massa causada pela aplicação de ultrassom em um meio supercrítico.

No entanto, esses estudos utilizam apenas a combinação de ultrassom com SFE e, devido às semelhanças técnicas entre SFE e PLE em termos de

equipamentos, é possível assumir que a combinação de UAE e PLE é possível e com grande potencial para ser explorada, mesmo que em processos de pequena escala, como na preparação de amostras para a análise de compostos bioativos em produtos naturais e em separações de escala semipreparativa. Com o desenvolvimento crescente de equipamentos, é viável considerar oportunidades comerciais com base na extração de compostos bioativos em escala industrial, com ganhos econômicos valiosos [30].

Apesar do grande potencial, não existem aplicações de ultrassom combinadas com PLE na literatura científica até o momento. Portanto, é necessário estudar como as variáveis de processo (temperatura, solvente, potência de ultrassom, pressão, tamanho de partícula, tempo) interagem e afetam a extração de compostos bioativos em produtos naturais. Portanto, este trabalho avaliou a possibilidade de combinar duas técnicas de extração (UAE + PLE = UAPLE) para melhorar o rendimento da extração de compostos fenólicos da casca de romã, verificando a influência de variáveis importantes no processo.

### 1.1. Compostos funcionais e romã

Os alimentos contêm macro e micronutrientes necessários para o funcionamento do organismo humano, como também outros tipos de compostos que são benéficos ao funcionamento fisiológico do organismo, especialmente os presentes nos alimentos de origem vegetal, que são denominados compostos funcionais [31]. Os ingredientes funcionais foram definidos como um grupo de compostos que apresentam benefícios à saúde, tais como as alicinas presentes no alho, os carotenoides e flavonoides encontrados em frutas e vegetais, os glucosinolatos encontrados nos vegetais crucíferos os ácidos graxos poli-insaturados presentes em óleos vegetais [32].

Considerando as diferentes partes da romã *Punica granatum* L. mostradas na **Figura 1** (casca, membrana carpelar, arilo e semente), a casca se destaca quanto à atividade antioxidante e a quantidade de compostos fenólicos em relação à polpa do fruto, demonstrando seu potencial a ser explorado como ingrediente funcional [3].

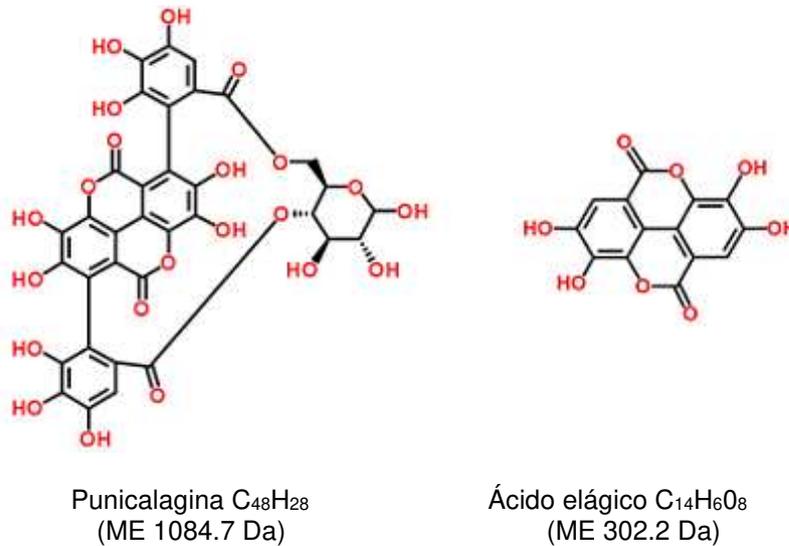
**Figura 1** - Partes do fruto da romã.



Os compostos fenólicos principais presentes na casca de romã são: punicalagina (classe de elagitaninos), ácido elágico e derivados da punicalagina e do ácido elágico (**Figura 2**) [4]. Neste contexto, é importante que alternativas tecnológicas sejam desenvolvidas com o intuito de viabilizar a utilização da casca de romã, por ter um grande valor biológico.

As punicalaginas são os principais compostos com atividade antioxidante presente na romã, com uma atividade entre cinco e dez vezes superior à do ácido elágico, e são encontradas em maior quantidade na casca [33]. Existem diversas evidências que apontam o potencial das punicalaginas e dos compostos relacionados para a prevenção de diversas doenças, como câncer e doenças cardiovasculares [34][35]. Estes compostos são solúveis em água e apresentam uma alta absorção no trato gastrointestinal (>95%). Outra característica importante destes compostos é sua baixa toxicidade, o que garante seu uso de forma segura. As punicalaginas, por exemplo, não apresentam efeitos tóxicos em ratos quando alimentos com quantidades superiores a 6% durante 37 dias [36].

**Figura 2** - Estrutura química dos principais compostos presentes na casca de romã.



O ácido elágico (C<sub>14</sub>H<sub>6</sub>O<sub>8</sub>) é um dímero derivado do ácido gálico [4]. Portanto, os produtos elaborados a partir de extratos da casca e membranas carpelares podem ser uma fonte importante destes compostos que apresentam alta bioatividade. Comumente encontrado em muitas plantas, o ácido elágico exibe potentes propriedades anticancerígenas e antioxidantes, como a indução de parada e apoptose do ciclo celular [37].

## 1.2. Câncer

Com o aumento da incidência mundial do câncer, grandes esforços têm sido realizados na busca da cura ou controle desta enfermidade. As particularidades biológicas inerentes a cada tipo de tumor, assim como a resistência aos quimioterápicos é o que impulsiona a pesquisa de novos constituintes químicos potencialmente ativos contra as células tumorais [38]. Pesquisas envolvendo produtos naturais vêm sendo realizadas na busca de terapias adjuvantes alternativas aos quimioterápicos sintéticos. Muitos trabalhos recentes têm demonstrado que extratos de romã apresentam importante atividade antitumoral [39][40][41][42][43][44].

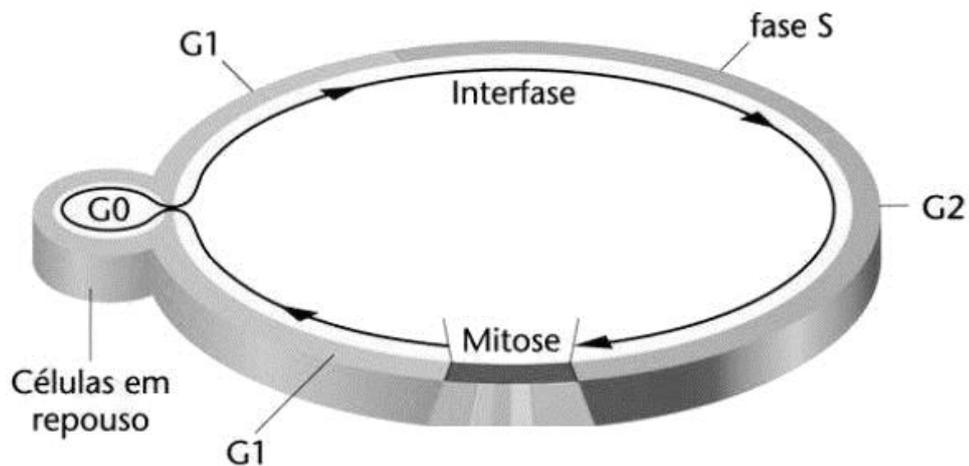
O câncer é uma enfermidade multifatorial estando incorporada ao ambiente, por meio de fatores físicos, químicos e biológicos além de fatores genéticos que desempenham um papel direto ou indireto na indução e agravamento da doença. Evidências epidemiológicas mostram que uma dieta rica em antioxidantes reduz significativamente o risco de muitos cânceres, sugerindo que certos dietéticos antioxidantes podem ser agentes eficazes na prevenção, incidência e mortalidade por

câncer [45]. Tais agentes presentes na dieta são grupos formados por compostos muito promissores devido à segurança, baixa toxicidade e aceitação geral. Conseqüentemente a identificação e desenvolvimento destes agentes tornou-se uma importante área de pesquisa sobre o câncer experimental [46].

O crescimento celular está relacionado com a fusão ou divisão de duas células. Tal processo ocorre de forma ordenada e organizada. O processo de iniciação do ciclo celular ocorre por meio de replicação, envolvendo anteriormente um período de crescimento celular seguido pela divisão, caracterizando dessa forma o ciclo celular. O ciclo de uma célula não tumoral (**Figura 3**) é dividido didaticamente em etapas compreendendo a interfase com as fases G0, G1, S e G2 e a mitose denominada de fase M [47].

Em G0, a estrutura de DNA encontra-se enovelada e não apta para replicação celular. Em G1, as células são estimuladas a se multiplicar. No estágio S, ocorre a síntese de DNA. Em G2, ocorre a síntese de RNA e de proteínas, dando continuidade do ciclo celular seguido pelo estágio M (mitose), que corresponde à divisão celular propriamente dita [48].

**Figura 3** - Etapas do ciclo celular.



Cada fase do ciclo possui os chamados *checkpoints* (pontos de checagem), que podem parar a progressão do ciclo celular e a ativação de mecanismos de reparo [49]. Uma vez que as células progredam para a fase seguinte sem passar pelos *checkpoints*, o dano ao DNA e/ou mau funcionamento das organelas e estruturas podem ativar a parada do ciclo e estas podem sofrer apoptose, uma vez que o dano não seja reparado [50].

Os *checkpoints* operam na transição da fase G1 para S. Nas células cancerosas, os *checkpoints* são geralmente ignorados gerando assim instabilidade genética e vantagem proliferativa das células neoplásicas quando comparadas com as células normais [51]. Por conseguinte, as células neoplásicas diferem das células normais, pois apresentam a capacidade de continuarem crescendo e dividindo-se, não obedecendo ao controle biológico e fisiológico do organismo normal através dos pontos de checagem [52].

As potenciais propriedades terapêuticas da romã são abrangentes e incluem efeitos anti-inflamatórios, tratamento e prevenção de câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e outros [53]. A romã mostrou potencial no tratamento de vários tumores e muitos estudos demonstraram que os extratos de romã inibem a proliferação de células de cólon, mama, pulmão, pâncreas e câncer de próstata in vitro [54][55]. Poucos estudos investigaram o potencial da romã no tratamento ou prevenção da leucemia, especialmente dos extratos de casca para esta aplicação [56][57][58].

A leucemia é um transtorno maligno de glóbulos brancos e órgãos formadores de sangue, caracterizado por proliferação descontrolada de células brancas, resultando em colapso da medula óssea e diminuição da produção e função de células hematopoiéticas normais [57]. O tratamento da leucemia requer a combinação de quimioterapia, radioterapia e mesmo transplante de medula óssea. A cura depende de muitos fatores, como o tipo histológico de leucemia, estágio da doença, idade do paciente, antecedentes genéticos e saúde geral [59]. Mas, em muitos casos, o tratamento falha devido principalmente à resistência e metástase aos medicamentos [60][61].

A citotoxicidade dessas terapias para células normais e o fato de que certos agentes de quimioterapia podem causar toxicidade da medula óssea também foram uma limitação severa do tratamento com leucemia [59]. Um grande número de pesquisadores em todo o mundo estão investigando novas estratégias de tratamento de câncer usando componentes naturais de plantas, como compostos fenólicos e muitos outros compostos bioativos [63][63][64][65].

A maioria dos relatórios científicos referentes ao tratamento ou prevenção de romã e câncer tem sido focado nas funções das partes comestíveis do fruto (sementes e suco). Recentemente, foi dada mais atenção às suas partes não comestíveis, como cascas, folhas, flores, cascas e raízes [66][67]. A casca contém o

conjunto mais promissor de compostos fenólicos em comparação com as demais partes anatômicas da fruta de romã [66]. As potentes atividades antioxidantes, antiproliferativas, proapoptóticas e anticancerígenas da romã são, portanto, atribuídas a esses polifenóis [57].

## 2. OBJETIVOS GERAIS

- I. Durante a UAE, avaliar os efeitos da temperatura, frequência, modo de aplicação de ultrassom e suas interações, na recuperação dos compostos fenólicos e antioxidantes presentes na casca de romã;
- II. Durante UAPLE (UAE + PLE), consolidar a possibilidade de combinação/acoplamento entre as duas técnicas utilizando casca de romã como amostra e avaliar o efeito dos principais parâmetros de extração e de suas interações no rendimento de extração;
- III. Durante UAPLE, avaliar a adequação de solventes GRAS (*Generally Recognized As Safe*) permitidos para alimentos (como etanol e água);
- IV. Avaliar o efeito biológico de extratos obtidos com diferentes solventes em células tumorais de monócitos humanos (THP-1).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS**

#### **3.1. Reagentes químicos e solventes**

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico ou de maior pureza possível. Os padrões dos compostos fenólicos  $\alpha$ -punicalagina ( $\alpha$ -pun),  $\beta$ -punicalagina ( $\beta$ -pun) e ácido elágico (AE), ácido gálico monohidratado foram comprados da empresa Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, Estados Unidos). Etanol, metanol, carbonato de sódio anidro e ácido fórmico foram comprados da Labsynth (Diadema, São Paulo, Brasil). O reagente fenólico Folin-Ciocalteu foi comprado da Dynamica (São Paulo, SP, Brasil). A água tipo I utilizada foi fornecida pelo sistema Mili-Q Advantage A10 (Millipore, Bedford, MA, Estados Unidos). Acetonitrila de grau HPLC foi comprada da empresa J.P. Baker (Darmstadt, Alemanha) e o ácido fosfórico (85% P.A.) da Ecibra (São Paulo, Brasil).

#### **3.2. Tratamento das amostras**

Romã (variedade Wonderful) cultivadas na Califórnia (EUA) foram adquiridas em um estabelecimento de Limeira/SP (Brasil). As amostras foram processadas quebrando a fruta e separando as sementes e arilos das cascas, com auxílio de um despolpador comercial (Des-60 Braesi, Caxias do Sul, Brasil). As cascas (exocarpo e membrana carpelar) foram secas a 70 °C em estufa de circulação com ar forçado (JP Selecta, Barcelona, Espanha) durante 48 horas e, em seguida, trituradas com auxílio de um triturador convencional (Philips, mod.RI-2034, Brasil). As amostras trituradas foram peneiradas e armazenadas a -20 °C em frascos de vidro âmbar até a preparação dos extratos. O teor de umidade das amostras ( $6.50 \pm 0.00\%$ ) foi determinado em estufa com convecção de ar a 105 °C (Marconi, MA030/12, Piracicaba, Brasil).

#### **3.3. Caracterização dos extratos**

Todas as análises descritas nas sessões seguintes foram realizadas para caracterizar os extratos obtidos com as diferentes condições de extração testadas. Cada análise foi repetida duas vezes para cada extrato. Os resultados dos testes foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

### **3.3.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

As análises dos compostos individuais presentes nos extratos foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência. A separação dos compostos foi realizada utilizando uma adaptação do método desenvolvido por Rostagno et. al. [33]. Os compostos foram separados utilizando uma coluna tipo Fused-core (Kinetex C<sub>18</sub>, 2.6 µm, 100 Å, 100 × 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, Estados Unidos). O equilíbrio entre as análises foi de 3 minutos e o volume de injeção foi de 5 µL.

No Capítulo I, a coluna foi mantida em temperatura ambiente e fluxo a 1.35 mL/min. A fase móvel foi composta de água (1% de ácido fosfórico v:v) (solvente A) e acetonitrila (1% de ácido fosfórico v:v) (solvente B). O perfil de gradiente foi: 5 min (98% A); 15 min (80% A); 18 min (65% A); 20 min (10% A); 24 min (10% A); 25 min (98% A). Os picos dos compostos presentes nos extratos foram integrados a 378 nm.

Nos Capítulos II e III. A coluna foi mantida em temperatura ambiente e fluxo a 0.9 mL/min. A fase móvel foi composta de água (1% de ácido fosfórico v:v) (solvente A) e metanol (1% de ácido fosfórico v:v) (solvente B). O perfil de gradiente foi: 8.15 min (90% A); 12.6 min (70% A); 21.6 min (50% A); 25 min (10% A); 29 min (10% A) e 30 min (96% A). Os picos dos compostos presentes nos extratos foram integrados a 370 nm.

A identificação de cada composto foi realizada pela comparação dos tempos de retenção dos picos obtidos na análise dos extratos com os picos obtidos na análise dos padrões autênticos. Soluções estoque dos padrões de punicalagina (100 mg/L) e ácido elágico (110 mg/L) foram preparados em metanol. As curvas padrões da punicalagina (cinco pontos: 5, 10, 25, 50 e 100 mg/L) e do ácido elágico (quatro pontos: 5.63, 11.25, 22.5 e 110 mg/L) foram preparadas através da representação gráfica correlacionando a concentração versus a área. O traçado das curvas, bem como os seus ajustes por regressão linear e cálculo do coeficiente de correlação ( $r^2$ ), foram feitos utilizando o software Microsoft Office Excel 2010. Todas as análises foram realizadas em duplicata e os resultados foram expressos como mg de composto fenólico/g de amostra em base seca (bs).

### 3.3.2. Identificação dos compostos fenólicos por UHPLC-MS/MS

As análises dos compostos presentes nas amostras foram realizadas utilizando o instrumento UHPLC-MS/MS 8040 (Shimadzu, Kyoto, Japão) que consiste de um sistema de cromatografia líquida acoplado a um espectrômetro de massa triplo quadrupolo, equipado com uma fonte de ionização por eletronebulização (ESI). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna C18 Kinetex 2.6  $\mu\text{m}$ , 3 mm i.d., coluna de 100 mm (Phenomenex, Califórnia, EUA), fase móvel binária, solvente A (água) e solvente B (acetonitrila acidificada com 0.1% de ácido fórmico) [33]. O gradiente de eluição a 40 °C, com fluxo de 0.3 mL/min foi feito da seguinte maneira: 0 min (100% A); 2 min (90% A); 7 min (85% A); 13 min (70% A); 16 min (70% A); 20 min (60% A); 24 min (20% A). Os picos foram integrados a 260 nm, a temperatura do amostrador automático foi mantida em 10 °C e o volume de injeção de 10  $\mu\text{L}$ .

Os parâmetros ESI foram ajustados da seguinte forma: tensão capilar de -3.5 kV; temperatura do bloco térmico em 500 °C; temperatura da linha de dessolvatação em 250 °C; fluxo do gás de secagem ( $\text{N}_2$ ) de 10 L/min; nebulização de fluxo de gás ( $\text{N}_2$ ) de 1.5 L/min; colisão induzida por dissociação pressão de gás (Ar) em 224 kPa. Para cada composto, primeiramente os dados ESI (-)-MS/MS foram coletados por sua molécula desprotonada  $[\text{M}-\text{H}]^-$  e dois dos seus íons de produto mais seletivos foram escolhidos para as transições MRM usando 20 ms de tempo de interrupção. Os dados foram adquiridos e processados pelo software Labsolution (versão 5.53 SP2, Shimadzu). A identificação dos compostos baseou-se na sua massa ( $m/z$ ), tempo de retenção e coeluição com os padrões autênticos disponíveis.

Dos 20 compostos fenólicos quantificados por HPLC nos Capítulos I, II e III, sete foram identificados por UHPLC-MS/MS, baseados em suas massas ( $m/z$ ), tempo de retenção e coeluição comparados com padrões autênticos disponíveis e com os compostos identificados na romã por Fisher, 2011 [4]. Os espectros de massa, nomes, fragmentos de íons e tempos de retenção estão apresentados na **Tabela 1**. Os espectros de massa dos compostos fenólicos identificados estão exibidos na **Figura 4**.

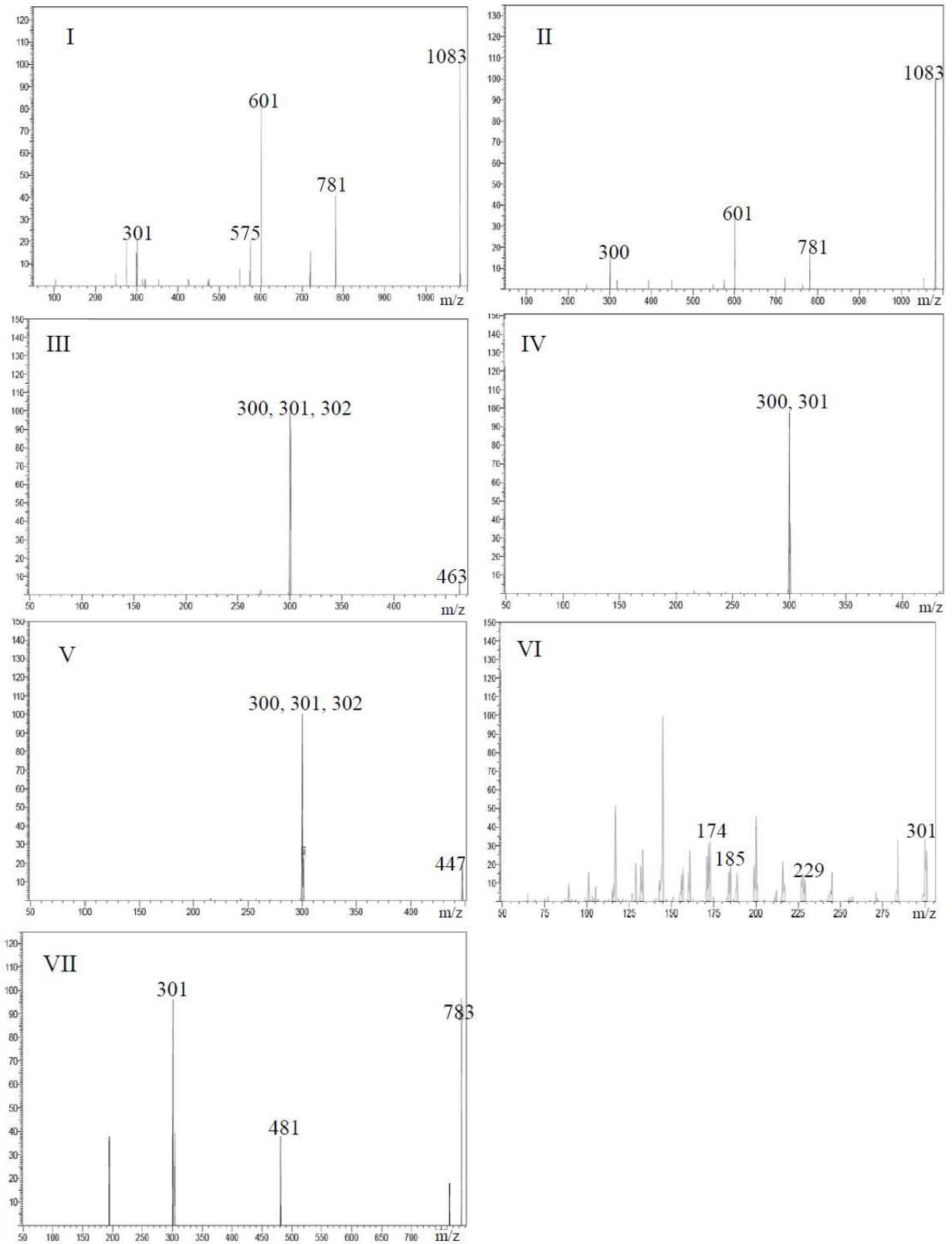
Os Principais Compostos Fenólicos (PCF) estavam presentes em grandes quantidades na maioria dos extratos:  $\alpha$  punicalagina ( $\alpha$ -pun,  $m/z$  1083, tempo de retenção de 8.3 min, pico #8),  $\beta$  punicalagina ( $\beta$ -pun,  $m/z$  1083, tempo de retenção 13.1 min, pico #11), ácido elágico hexoside (AE-hex,  $m/z$  463, tempo de retenção 18

min, pico #14) e ácido elágico (AE, m/z 301, retenção tempo 21.1 min, pico #19). Os Outros Compostos Fenólicos (OCF) estavam presentes em pequenas quantidades na maioria dos extratos, dentre esses, foram possíveis de serem identificados: o ácido elágico pentosídeo (AE-pent, m/z 443, tempo de retenção 20.2 min, pico #17), ácido elágico desoxihexosídeo (AE-desoxihex, m/z 447, tempo de retenção 20.5 min, pico #18) e peduncalagina I (Pedun I, m/z 783, tempo de retenção 22.6 min, pico #20). Todos os compostos identificados foram relacionados ao ácido elágico por apresentarem o íon molecular característico 301. Os compostos identificados presentes na amostra estão de acordo com os relatados na literatura para cascas de romã [4].

**Tabela 1** - Caracterização química por UHPLC-MS/MS da casca da romã.

Número do espectro	Nomenclatura	HPLC–ESI(–) MS <sup>2</sup>	[M–H] <sup>–</sup> m/z	Tempo de retenção (min)	Nº pico (HPLC)
I	α-pun	301, 575, 601,	1083	8.3	8
II	β-pun	300, 601, 781	1083	13.1	11
III	AE-hex	300, 301, 302	463	18.0	14
IV	AE-pent	300, 301	443	20.2	17
V	AE-deoxyhex	300, 301, 302	447	20.5	18
VI	AE	174, 185, 229	301	21.1	19
VII	Pedun I	301, 481	783	22.6	20

**Figura 4** - Espectros de massas dos principais compostos fenólicos presentes nos extratos da casca de romã.



## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## **CAPÍTULO I**

**Extração de compostos fenólicos e antioxidantes da casca da romã utilizando ultrassom: influência da temperatura, frequência e modo de operação**

## **CAPÍTULO I**

### **Extração de compostos fenólicos e antioxidantes da casca da romã utilizando ultrassom: influência da temperatura, frequência e modo de operação**

#### **1. INTRODUÇÃO**

A aplicação de ultrassom permite, em alguns casos, melhorar o desempenho do processo de extração em termos de rapidez e consumo de solventes. As extrações assistidas por ultrassom (UAE) foram realizadas utilizando banho de ultrassom que possibilita selecionar a frequência de operação (37 e 80 kHz), diferentes modos de aplicação do ultrassom (contínuo, sweep e pulsos) e também possibilita variar a temperatura. Após analisar os extratos obtidos pelas diferentes condições de extração através de métodos qualitativos e quantitativos, foi possível selecionar as melhores condições de extração em relação à recuperação dos compostos fenólicos e antioxidantes presentes na casca de romã.

#### **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

##### **2.1. Extração assistida por ultrassom**

As extrações assistidas por ultrassom foram realizadas utilizando banho de ultrassom (Elmasonic, modelo P60H, Singen, Alemanha) com potência em 180/150 W (potência máxima do equipamento – 100%). Esse equipamento permite selecionar a frequência de operação (37 e 80 kHz) e também o modo de aplicação do ultrassom (contínuo, sweep e pulsos). O modo sweep consiste na oscilação eletrônica do campo sonoro, que é designado para prevenir a formação de zonas de baixo desempenho no banho ultrassônico; o modo pulsos opera pela irradiação intermitente do ultrassom (automaticamente programado pelo equipamento) com a intenção de aumentar em até 20% a intensidade da radiação ultrassônica original.

Para avaliar o efeito da temperatura, frequência e modo de operação ultrassônico na extração dos compostos fenólicos e antioxidantes da casca de romã, as UAE foram realizadas a 40, 50, 60 e 70 °C; frequências em 37 e 80 kHz e modos de operação contínuo, pulsos e sweep, totalizando 24 condições experimentais, as quais foram realizadas aleatoriamente e em duplicata. Para todos os ensaios, aproximadamente, 1.0 g da matéria-prima foi misturado com 25 mL do solvente

extrator (70% etanol em água – v:v), equivalente a uma relação de solvente para alimentação de 25:1 (*Solvent to Feed* – S:F) e sonicados por 20 minutos a pressão ambiente. Após a extração, os extratos foram imediatamente filtrados por um sistema a vácuo utilizando um papel filtro qualitativo de celulose e o volume remanescente foi medido. Os extratos foram filtrados através de um filtro de seringa de nylon (0.20 µm, Analítica, São Paulo, Brasil) acondicionados em vials de vidro âmbar a -18 °C até o momento das análises.

## 2.2. Compostos fenólicos totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais (FT) das amostras foi determinado de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu como descrito por Singleton et. al. [68], com algumas modificações. Em cada poço da microplaca foram adicionados em sequência, 20 µL das amostras diluídas, padrão ou branco, 100 µL da solução Folin-Ciocalteu 10%, após 5 minutos foram adicionados 75 µL da solução de carbonato de sódio 7.5% e em seguida, a microplaca foi mantida por 40 minutos ao abrigo da luz à temperatura ambiente e realizada a leitura a 740 nm em um espectrofotômetro (Hach, Mod.DR/4000, Estados Unidos) utilizando água como branco. O ácido gálico foi utilizado para plotar a curva padrão (20 a 120 mg/L) e os resultados foram expressos em termos de mg Equivalente de Acido Gálico (mg EAG)/g de amostra seca (bs). A análise de cada extrato foi feita em duplicata.

## 2.3. Rendimento global de extrato

Os extratos obtidos nas diferentes condições de operação foram avaliados quanto ao rendimento global de extrato ( $X_0$ ), que é definido como a razão de massa entre o extrato e a matéria-prima utilizada no processo, conforme expresso na Equação 1.

$$X_0(\%) = \frac{m_{\text{extrato}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde, “ $m_{\text{extrato}}$ ” representa a massa total de extrato (em base seca) obtida no processo extrativo e “ $m_{\text{amostra}}$ ” a massa de matéria-prima (em base seca) utilizada no processo de extração em gramas. Para determinar o rendimento global de extrato o extrato, a alíquota de 5 mL do extrato foi evaporada a 70 °C em uma estufa com

ventilação forçada (Marconi, MA030/12, Piracicaba, Brasil), no qual as amostras foram mantidas até atingir peso constante.

#### 2.4. Análise estatística

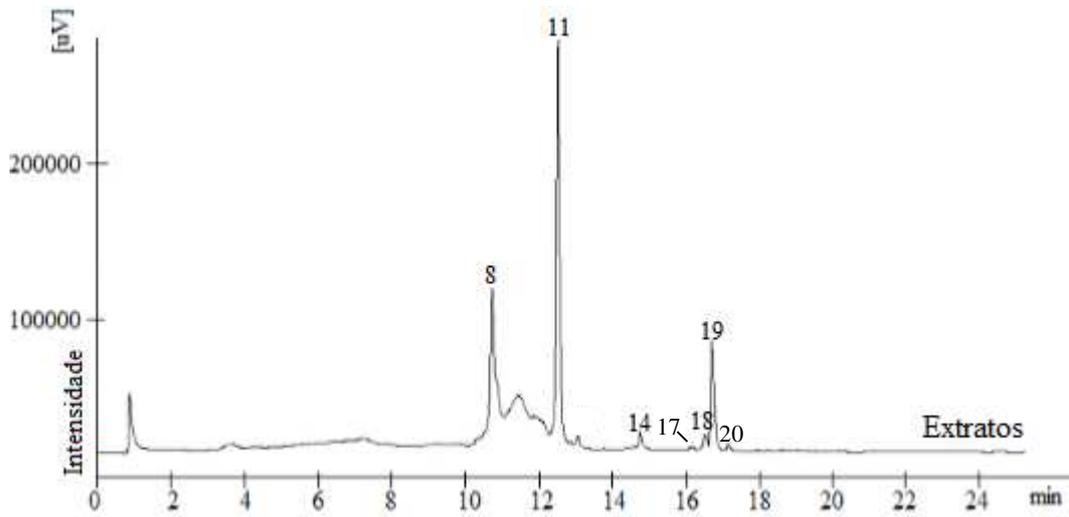
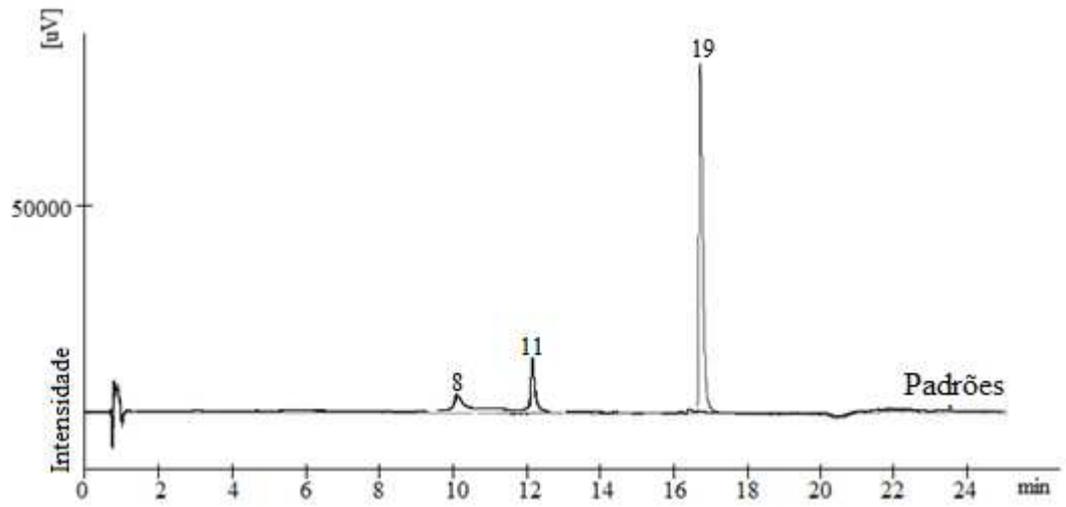
Os resultados das análises foram avaliados através da análise de variância (ANOVA), ao nível de significância de 5% ( $p\text{-valor} \leq 0.05$ ), seguido pelo teste de Tukey, utilizando o software Minitab versão 16 (Minitab 16.1.0, Minitab Inc., State College, PA, EUA). Entre os diferentes parâmetros analisados, o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) foi calculado usando o software Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, Washington, EUA).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cromatogramas representativos dos padrões e análises dos extratos da casca de romã com absorvância monitorada em 378 nm estão mostrados na **Figura 5**. Os picos identificados como 8, 11 e 19 correspondem aos compostos  $\alpha$ -pun,  $\beta$ -pun e AE, respectivamente.

A **Tabela 2** apresenta o rendimento de extração dos compostos  $\alpha$ -pun,  $\beta$ -pun, AE e somatória de todos os compostos fenólicos determinados por HPLC. A **Tabela 3** apresenta os resultados de fenólicos totais (FT) por espectrofotometria e o rendimento global de extrato ( $X_0$ ) encontrados nos extratos provenientes da casca de romã. A análise estatística (ANOVA) e a correlação entre os parâmetros analisados são apresentadas nas **Tabelas 4 e 5**, respectivamente. As **Tabelas 2 e 4** mostram que as variáveis de processo investigadas (temperatura, frequência e modo de operação do ultrassom) tiveram efeito significativo na extração de  $\alpha$ -pun,  $\beta$ -pun e AE.

**Figura 5** - Cromatogramas representativos dos padrões e dos extratos a 378 nm.



**Tabela 2** - Rendimento de extração dos compostos fenólicos presentes nos extratos da casca de romã obtidos com diferentes temperaturas, frequências e modos de operação do ultrassom.

T (°C)	Frequência (kHz)/ Modo de operação	Rendimento de extração (mg/g bs)			
		$\alpha$ -pun	$\beta$ -pun	AE	POCF*
40	37/Contínuo	13.34 ± 0.12 <sup>AB,c</sup>	21.66 ± 0.38 <sup>A,b</sup>	1.98 ± 0.04 <sup>A,b</sup>	37.62 ± 0.55 <sup>A,c</sup>
	37/Pulso	14.64 ± 0.11 <sup>A,b</sup>	21.35 ± 0.40 <sup>A,a</sup>	2.08 ± 0.00 <sup>A,a</sup>	38.69 ± 0.57 <sup>A,b</sup>
	37/Sweep	12.75 ± 0.04 <sup>B,b</sup>	20.72 ± 0.06 <sup>A,b</sup>	2.05 ± 0.01 <sup>A,a</sup>	35.89 ± 0.18 <sup>AB,c</sup>
	80/Contínuo	13.86 ± 0.25 <sup>AB,ab</sup>	20.13 ± 0.06 <sup>A,b</sup>	1.98 ± 0.04 <sup>A,a</sup>	36.54 ± 0.38 <sup>A,b</sup>
	80/Pulse	13.74 ± 0.29 <sup>AB,b</sup>	20.16 ± 0.42 <sup>A,a</sup>	1.90 ± 0.12 <sup>A,b</sup>	36.42 ± 0.86 <sup>AB,b</sup>
	80/Sweep	12.68 ± 0.87 <sup>B,b</sup>	18.37 ± 0.73 <sup>B,b</sup>	1.86 ± 0.07 <sup>A,b</sup>	33.45 ± 1.70 <sup>B,b</sup>
50	37/Contínuo	14.80 ± 0.19 <sup>A,b</sup>	22.45 ± 0.04 <sup>A,ab</sup>	2.13 ± 0.03 <sup>A,a</sup>	40.05 ± 0.28 <sup>A,b</sup>
	37/Pulso	15.05 ± 0.20 <sup>A,ab</sup>	22.01 ± 0.43 <sup>AB,a</sup>	2.10 ± 0.01 <sup>AB,a</sup>	39.77 ± 0.67 <sup>A,ab</sup>
	37/Sweep	12.95 ± 0.10 <sup>C,b</sup>	21.27 ± 0.17 <sup>BC,b</sup>	2.07 ± 0.04 <sup>ABC,a</sup>	36.86 ± 0.32 <sup>C,b</sup>
	80/Contínuo	13.60 ± 0.12 <sup>B,b</sup>	20.62 ± 0.02 <sup>C,b</sup>	2.00 ± 0.04 <sup>BC,a</sup>	36.87 ± 0.19 <sup>C,ab</sup>
	80/Pulse	13.94 ± 0.14 <sup>B,b</sup>	21.11 ± 0.18 <sup>C,a</sup>	2.01 ± 0.01 <sup>BC,ab</sup>	37.64 ± 0.34 <sup>B,ab</sup>
	80/Sweep	12.90 ± 0.12 <sup>C,ab</sup>	21.15 ± 0.14 <sup>C,a</sup>	1.98 ± 0,01 <sup>C,ab</sup>	36.64 ± 0.28 <sup>C,ab</sup>
60	37/Contínuo	16.19 ± 0.06 <sup>A,a</sup>	24.29 ± 0.37 <sup>A,a</sup>	2.23 ± 0.03 <sup>A,a</sup>	43.20 ± 0.50 <sup>A,a</sup>
	37/Pulso	14.84 ± 0.04 <sup>A,a</sup>	22.46 ± 0.23 <sup>AB,a</sup>	2.07 ± 0.11 <sup>A,a</sup>	39.99 ± 0.41 <sup>B,ab</sup>
	37/Sweep	15.10 ± 0.83 <sup>A,a</sup>	22.72 ± 0.25 <sup>AB,a</sup>	2.10 ± 0.01 <sup>A,a</sup>	40.58 ± 1.14 <sup>AB,a</sup>
	80/Contínuo	14.90 ± 0.43 <sup>A,a</sup>	21.71 ± 0.51 <sup>B,a</sup>	2.14 ± 0,05 <sup>A,a</sup>	39.16 ± 0.99 <sup>B,a</sup>
	80/Pulse	14.72 ± 0.19 <sup>A,a</sup>	21.33 ± 0.96 <sup>B,a</sup>	2.08 ± 0.02 <sup>A,ab</sup>	38.89 ± 1.20 <sup>B,a</sup>
	80/Sweep	14.88 ± 0.29 <sup>A,a</sup>	21.67 ± 0.60 <sup>B,a</sup>	2.09 ± 0.04 <sup>A,a</sup>	39.22 ± 0.95 <sup>B,a</sup>
70	37/Contínuo	15.31 ± 0.17 <sup>AB,b</sup>	22.36 ± 0.41 <sup>AB,ab</sup>	2.16 ± 0.03 <sup>A,a</sup>	40.42 ± 0.64 <sup>A,b</sup>
	37/Pulso	15.48 ± 0.01 <sup>A,ab</sup>	22.62 ± 0.61 <sup>A,a</sup>	2.22 ± 0.77 <sup>A,a</sup>	40.94 ± 0.70 <sup>A,a</sup>
	37/Sweep	14.93 ± 0.18 <sup>ABC,a</sup>	22.44 ± 0.25 <sup>A,a</sup>	2.20 ± 0.03 <sup>A,a</sup>	38.17 ± 0.56 <sup>B,a</sup>
	80/Contínuo	14.67 ± 0.06 <sup>BC,a</sup>	22.02 ± 0.05 <sup>AB,a</sup>	2.08 ± 0.07 <sup>A,a</sup>	39.41 ± 0.22 <sup>AB,a</sup>
	80/Pulse	13.78 ± 0.08 <sup>D,b</sup>	21.63 ± 0.42 <sup>AB,a</sup>	2.16 ± 0.03 <sup>A,a</sup>	38.17 ± 0.56 <sup>B,ab</sup>
	80/Sweep	14.49 ± 0.40 <sup>CD,ab</sup>	20.96 ± 0.09 <sup>B,a</sup>	2.08 ± 0.02 <sup>A,a</sup>	38.14 ± 0.53 <sup>B,a</sup>

\*POCF: Soma de todos os compostos fenólicos extraídos da casca de romã; bs: amostra em base seca; Resultados expressos como média ± desvio padrão; Resultados com letras maiúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as frequências e o modo de operação do ultrassom na mesma temperatura, com nível de significância de 5%, de acordo com o teste de Tukey; Resultados com letras minúsculas iguais indicam que não há diferença entre temperaturas para as mesmas frequências e modos de operação do ultrassom, com nível de significância de 5%, de acordo com o teste de Tukey.

**Tabela 3** - Fenólicos totais e rendimento global de extrato obtidos da casca de romã utilizando diferentes temperaturas, frequências e modo de operação do ultrassom.

T (°C)	Frequência (kHz) / Modo de Operação	FT (mg EAG/g bs)	X <sub>0</sub> (%)
40	37/Contínuo	217.84 ± 23.36 <sup>AB,a</sup>	54.92 ± 1.53 <sup>AB,b</sup>
	37/Pulso	228.86 ± 4.36 <sup>AB,a</sup>	56.53 ± 0.36 <sup>A,a</sup>
	37/Sweep	199.79 ± 13.56 <sup>AB,ab</sup>	54.14 ± 0.36 <sup>AB,b</sup>
	80/Contínuo	232.91 ± 18.57 <sup>AB,a</sup>	53.00 ± 0.44 <sup>AB,d</sup>
	80/Pulse	257.57 ± 9.02 <sup>A,a</sup>	50.80 ± 1.69 <sup>B,a</sup>
	80/Sweep	160.48 ± 40.26 <sup>B,b</sup>	52.30 ± 1.04 <sup>B,a</sup>
50	37/Contínuo	193.71 ± 11.07 <sup>A,a</sup>	55.71 ± 0.02 <sup>A,ab</sup>
	37/Pulso	256.98 ± 34.20 <sup>A,a</sup>	57.05 ± 1.40 <sup>A,a</sup>
	37/Sweep	225.11 ± 16.57 <sup>A,a</sup>	56.12 ± 0.62 <sup>A,ab</sup>
	80/Contínuo	250.26 ± 58.72 <sup>A,a</sup>	54.71 ± 0.39 <sup>A,c</sup>
	80/Pulse	260.55 ± 42.99 <sup>A,a</sup>	54.39 ± 0.23 <sup>A,a</sup>
	80/Sweep	274.65 ± 3.17 <sup>A,a</sup>	54.53 ± 1.38 <sup>A,a</sup>
60	37/Contínuo	154.34 ± 16.21 <sup>A,a</sup>	59.02 ± 1.06 <sup>A,a</sup>
	37/Pulso	140.25 ± 1.47 <sup>A,b</sup>	56.35 ± 0.44 <sup>A,a</sup>
	37/Sweep	137.40 ± 6.89 <sup>A,c</sup>	57.84 ± 1.05 <sup>A,a</sup>
	80/Contínuo	135.85 ± 5.34 <sup>A,a</sup>	57.70 ± 0.09 <sup>A,a</sup>
	80/Pulse	130.06 ± 20.48 <sup>A,b</sup>	55.54 ± 0.93 <sup>A,a</sup>
	80/Sweep	141.81 ± 21.60 <sup>A,b</sup>	57.39 ± 1.65 <sup>A,a</sup>
70	37/Contínuo	155.73 ± 11.44 <sup>A,a</sup>	56.42 ± 0.03 <sup>A,ab</sup>
	37/Pulso	140.46 ± 18.42 <sup>A,b</sup>	54.87 ± 1.24 <sup>A,a</sup>
	37/Sweep	155.50 ± 3.68 <sup>A,bc</sup>	55.19 ± 0.57 <sup>A,ab</sup>
	80/Contínuo	152.39 ± 23.60 <sup>A,a</sup>	56.39 ± 0.13 <sup>A,b</sup>
	80/Pulse	147.15 ± 3.76 <sup>A,b</sup>	54.49 ± 1.69 <sup>A,a</sup>
	80/Sweep	149.64 ± 7.59 <sup>A,b</sup>	54.25 ± 0.77 <sup>A,a</sup>

FT: fenólicos totais determinados por espectrofotometria; EAG: equivalente de ácido gálico; bs: amostra em base seca; X<sub>0</sub>: rendimento global de extrato; Resultados expressos como média ± desvio padrão; Resultados com letras maiúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as frequências e o modo de operação do ultrassom na mesma temperatura, com nível de significância de 5%, de acordo com o teste de Tukey; Resultados com letras minúsculas iguais indicam que não há diferença entre temperaturas para as mesmas frequências e modos de operação do ultrassom, com nível de significância de 5%, de acordo com o teste de Tukey.

**Tabela 4** - Resumo da Análise de Variância (ANOVA): significância de fontes de variabilidade nos rendimentos de extração de  $\alpha$ -pun,  $\beta$ -pun, AE e PCF, FT e  $X_0$ .

Parâmetro	Variabilidade ( <i>p</i> -valor)						
	T ( $X_1$ )	Frequência ( $X_2$ )	Modo de Operação ( $X_3$ )	$X_1*X_2$	$X_1*X_3$	$X_2*X_3$	$X_1*X_2*X_3$
$\alpha$ -pun (mg/g bs)	< 0.001	0.003	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
$\beta$ -pun (mg/g bs)	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.061	0.015	0.275	0.011
AE (mg/g bs)	< 0.001	< 0.001	0.170	0.146	0.088	0.692	0.121
PCF (mg/g bs)	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.003	< 0.001	< 0.001	< 0.001
FT (mg EAG/g bs)	< 0.001	0.265	0.196	0.096	0.015	0.804	0.236
$X_0$ (%)	< 0.001	< 0.001	0.021	0.011	0.064	0.126	0.260

$\alpha$ -pun: rendimento de extração de  $\alpha$ -punicalagina;  $\beta$ -pun: rendimento de extração de  $\beta$ -punicalagina; AE: rendimento de extração de ácido elágico; PCF: rendimento de extração da soma dos principais compostos fenólicos; FT: fenólicos totais determinados por espectrofotometria; EAG: equivalente de ácido gálico;  $X_0$ : rendimento global de extrato; bs: amostra em base seca; diferença estatisticamente significativa quando  $p$ -valor $\leq$ 0.05.

### 3.1. Efeito da temperatura de extração

Os resultados indicam que a temperatura influenciou a extração de compostos fenólicos, o que é confirmado pela resposta ANOVA (**Tabela 4**). No geral, temperaturas entre 50 a 70 °C permitiram a extração de quantidades maiores de PCF e POCF que a 40 °C. Temperaturas mais altas promoveram aumento na eficiência de extração. Por exemplo, a 60 °C e 37 kHz (modo contínuo) foram extraídos 14.8% a mais de compostos fenólicos quando comparado com a quantidade extraída a 40 °C na mesma frequência e modo de operação. Neste contexto, a temperatura pode estar contribuindo para uma transferência de massa mais rápida dos polifenóis no solvente. Além disso, a energia térmica diminui a viscosidade e a tensão superficial do solvente líquido, podendo assim melhorar sua penetração na matriz da planta e resultar em um processo de extração mais eficiente [69]. Altas temperaturas ajudam a romper as interações entre o soluto e a matriz da planta, aumentando a extração. Nas mesmas condições acima citadas, a 60 °C e 37 kHz (modo contínuo), o rendimento global de extrato foi 7.5% maior que o calculado a 40 °C na mesma frequência e modo de operação. Ou seja,  $X_0$  aumentou quando temperaturas elevadas foram utilizadas,

indicando que a quantidade de analitos co-extraídos também aumenta com a temperatura e, portanto, a seletividade de extração pode não ter sido afetada.

Esperava-se que a temperatura influenciasse FT seguindo uma tendência similar à observada nos rendimentos de extração de  $\alpha$ -pun,  $\beta$ -pun e AE, uma vez que estes são os principais compostos presentes na amostra. No entanto, houve aumento na concentração de FT com temperatura até 50 °C e não até 70 °C, como observado nos rendimentos de extração de  $\alpha$ -pun,  $\beta$ -pun e AE determinados por HPLC. Outros compostos fenólicos que não foram detectados podem ter sido degradados a uma taxa mais rápida do que a taxa de extração de  $\alpha$ -pun,  $\beta$ -pun e AE, resultando em um saldo negativo de FT quando comparado com a análise por HPLC. Por outro lado, apenas pequenas diferenças foram observadas entre os resultados de FT obtidos a temperaturas de 60 e 70 °C, independentemente da frequência e do modo de operação de ultrassom utilizados.

Na maioria dos processos de extração, a temperatura pode ser aumentada até um limite, o que é alcançado quando a degradação/oxidação dos compostos alvo aumenta a uma taxa maior do que o aumento da transferência de massa pelo uso de temperaturas mais elevadas no processo. Mesmo que quantidades maiores sejam realmente extraídas da matéria-prima, a quantidade final presente no extrato será a mesma ou menor, devido à maior degradação dos compostos alvo. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que, para a extração de compostos fenólicos de cascas de romã, esse limite é de cerca de 60 a 70 °C, uma vez que acima desta temperatura pode haver uma diminuição dos compostos fenólicos extraídos. Estes resultados estão de acordo com relatórios anteriores sobre os efeitos da temperatura na extração de polifenóis da casca de romã [70][71].

### **3.2. Efeito da frequência de ultrassom**

Os resultados da **Tabela 2** indicam uma ligeira melhora na extração de  $\alpha$ -pun,  $\beta$ -pun e AE usando a frequência mais baixa de 37 kHz, para todos os modos de operação testados (contínuo, pulso e sweep) e em todas as temperaturas, de acordo com os resultados obtidos por HPLC e de acordo com o rendimento global de extrato ( $X_0$ ). Essa tendência pode estar relacionada às bolhas maiores formadas em frequências ultrassônicas mais baixas (maior amplitude), produzindo assim uma maior força de implosão e cisalhamento na amostra, o que resulta em temperaturas e pressões mais altas na zona de cavitação, em oposição às frequências mais altas

(menor amplitude) [73]. Portanto, 37 kHz pode ocasionar maior ruptura celular e maior transferência de massa que 80 kHz.

Os resultados da ANOVA mostram que tanto a frequência como suas interações com outras variáveis de extração têm efeitos significativos em PCF e em  $X_0$ . As diferenças entre frequências nem sempre foram estatisticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ), devido a outras possíveis interações com o modo de aplicação e temperatura.

A casca de romã é certamente um material complexo em termos de compostos fenólicos totais, em que muitas interações físico-químicas podem estar afetando os resultados. Portanto, não se deve presumir que baixas frequências ultrassônicas sejam sempre mais eficientes do que as mais altas nos processos de extração. À medida que a frequência aumenta, a zona de cavitação torna-se menos intensa e o mecanismo principal torna-se a transmissão acústica [73]. Isso pode levar a um efeito mais suave e melhorar a extração de compostos que são sensíveis ao fenômeno físico da cavitação.

Existem alguns estudos [74][75] sobre a influência do uso simultâneo de duas ou mais frequências de ultrassom para a extração de certas substâncias. Nestes trabalhos, rendimentos mais elevados geralmente são obtidos com múltiplas frequências em comparação com as condições em que apenas um foi utilizado. Por exemplo, rendimentos mais elevados de bioquianina A (isoflavona), foram obtidos com a combinação de 25-80 kHz e 25-40-80 kHz do que ao utilizar frequências únicas [74]. Sugeriu-se que uma bolha de cavitação sob duas ondas sobrepostas tenha uma dinâmica diferente de uma única onda [76]. A quantidade aumentada de analitos extraídos por radiação de duas e frequências múltiplas pode ser explicada pela maior colisão de bolhas de cavitação que causa uma redução adicional no tamanho de partícula, melhorando a transferência de massa [77].

### **3.3. Efeito do modo de operação do ultrassom**

No geral, os modos contínuo e pulso resultaram em rendimentos semelhantes e ligeiramente maiores para  $\alpha$ -pun e  $\beta$ -pun quando comparados com o modo sweep. No entanto, dependendo da temperatura e da frequência, o modo sweep proporcionou resultados tão bons quanto os obtidos com os demais modos de operação do ultrassom, como observados para  $\beta$ -pun a 40 e 60 °C em 37 kHz;  $\alpha$ -pun a 60 °C em 37 e 80 kHz; e  $\alpha$ -pun e  $\beta$ -pun a 70 °C em 37 kHz. Ou seja, existe uma interação

significativa entre o modo de operação e as demais variáveis (temperatura e frequência), como foi sugerido pelos resultados da ANOVA. Na maioria dos casos, os resultados obtidos com o uso do modo de sweep não foram melhores que os resultados obtidos com o uso dos demais modos de operação, possivelmente devido ao efeito negativo da cavitação e da dinâmica da bolha.

Estudos mostram que o uso do modo pulsos na extração assistida por ultrassom foi eficaz para melhorar a extração de compostos de cascas de romã [23], bem como de outras matrizes [78][79], exigindo menor tempo e consumindo menos energia, solventes e outros produtos químicos [23][72]. Apesar da evidência na literatura, no presente trabalho não houve diferença significativa no rendimento dos compostos fenólicos ao fazer uso dos modos pulsos ou contínuo, em diferentes temperaturas e frequências, fato que pode estar relacionado ao uso do banho ultrassônico ao invés de uma sonda ultrassônica, como utilizada nos estudos mencionados. O uso da sonda ultrassônica pode proporcionar melhora na extração de compostos fenólicos devido à maior intensidade que as ondas sonoras são transmitidas para um ponto focado. Portanto, mesmo que o modo de pulso usado no banho ultrassônico possa transmitir até 20% mais de potência, tal intensidade adicional não resultou em melhora na taxa de extração dos compostos fenólicos da casca de romã neste estudo. No entanto, os valores de PCF, POCF, FT e  $X_0$  obtidos foram altos, sugerindo que os processos de extração de banhos ultrassônicos também são eficientes para a recuperação de compostos bioativos de cascas de romã.

### 3.4. Correlação entre FT e $X_0$

A fim de correlacionar os resultados obtidos pelas diferentes análises, foram realizadas análises de regressão linear e determinado o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) (**Tabela 5**). Correlação forte foi verificada entre  $X_0$  e PCF ( $r=0.778$ ), mostrando que a presença dos principais compostos fenólicos influencia no rendimento global de extrato. Correlação fraca foi verificada entre FT e PCF ( $r=0.443$ ) e entre FT e  $X_0$  ( $r=0.440$ ). Além dos compostos fenólicos identificados,  $\alpha$ -pun e  $\beta$ -pun e AE, outros polifenóis podem estar em abundância nos extratos, possivelmente variando de polifenóis de alto peso molecular (como elagitaninos, proantocianidinas, flavonoides e compostos fenólicos ligados a polissacarídeos complexos) aos mais simples.

**Tabela 5** - Correlações entre FT e X<sub>0</sub>.

Coeficiente Correlação Pearson (r)	FT (mg EAG/g bs)	X <sub>0</sub> (%)
PCF (mg/g bs)	0.443	0.778
FT (mg EAG/g bs)	-	0.400

PCF: rendimento de extração da soma dos principais compostos fenólicos obtido por HPLC; FT: fenólicos totais determinados por espectrofotometria; EAG: equivalente de ácido gálico; bs: amostra em base seca; X<sub>0</sub>: rendimento global de extrato.

#### 4. CONCLUSÕES

O presente trabalho mostrou que todas as variáveis em estudo (temperatura, frequência de ultrassom e modo de operação) tiveram um efeito significativo na extração de compostos fenólicos ( $\alpha$ -pun,  $\beta$ -pun e AE) da casca de romã, bem como sobre FT e X<sub>0</sub>. No geral, os melhores resultados em termos de rendimento de extração de compostos fenólicos nos extratos foram observados com temperaturas de 50 a 70 °C, utilizando frequência de ultrassom em 37 kHz, nos modos de operação contínuo e pulso. Devido ao alto rendimento de extração dos compostos fenólicos, observou-se correlação forte entre PCF com X<sub>0</sub> ( $r=0.778$ ). Os resultados indicaram que a extração UAE utilizando solvente etanol 70% (v:v) é uma técnica adequada e segura para a recuperação de compostos fenólicos da casca de romã.

## **CAPITULO II**

**Extração de compostos bioativos a partir da casca de romã  
(*Punica granatum L.*) utilizando líquidos pressurizados  
combinados com ultrassom**

## CAPITULO II

### **Extração de compostos bioativos a partir da casca de romã (*Punica granatum L.*) utilizando líquidos pressurizados combinados com ultrassom**

#### **1. INTRODUÇÃO**

Apesar do grande potencial, não existe até o momento aplicações da técnica UAPLE (*Ultrasound-Assisted Pressurized Liquid Extraction*) utilizando como matéria-prima a casca da romã. Os poucos estudos que existem envolvendo a aplicação de ultrassom a alta pressão indicam que a sua utilização pode aumentar a eficiência do processo de extração além de sua seletividade e rendimento. Apesar de que estes estudos foram realizados com fluidos supercríticos (SFE) e não com líquidos pressurizados (PLE) é de se esperar que a combinação de ultrassom também produza efeitos positivos no processo devido a um aumento na transferência de massas já que a PLE e a SFE são técnicas similares. Atualmente a tendência no desenvolvimento de métodos de extração é evitar a utilização de solventes orgânicos tóxicos e que não sejam ambientalmente compatíveis. Os solventes que estão sendo mais utilizados para a extração de compostos fenólicos que tem uso na alimentação humana incluem água, etanol e misturas.

#### **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

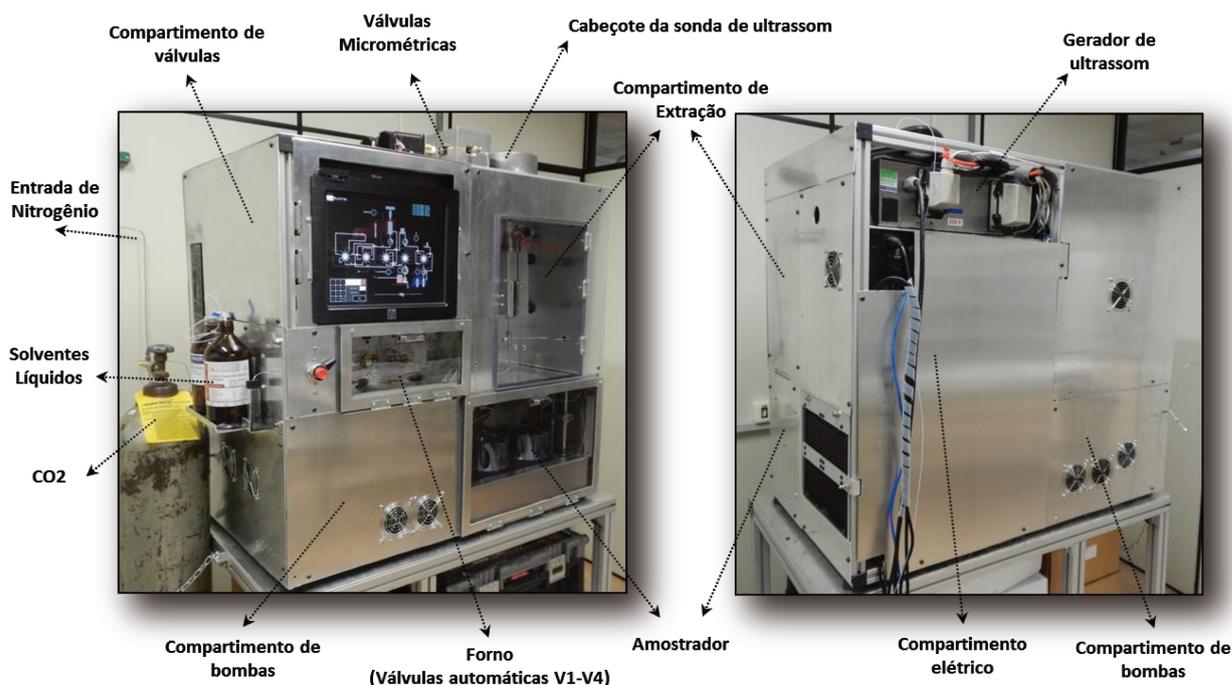
##### **2.1. Determinação do tamanho de partícula médio**

O tamanho da partícula da amostra foi determinado usando peneiras e agitador vibratório (Bertel Metallurgic Ind. Ltda., SP, Brasil) com os seguintes tamanhos de abertura sequenciais: 14, 18, 50 e 80 mesh (Equivalente à série Tyler, Wheeling, Estados Unidos). O diâmetro médio das partículas foi calculado de acordo com os Padrões da Sociedade Americana dos Engenheiros Agrícolas [80]. As amostras foram classificadas em dois grupos: 1. Partículas grandes, retidas em uma sequência de peneiras de 14 mesh (15.6%), 18 mesh (83.0%) e 50 mesh (1.4%): tamanho total 0.297-1.410 mm, tamanho de partícula médio de 1.05 mm; 2. Partículas pequenas, retidas em uma sequência de peneiras de 18 mesh (49.3%), 50 mesh (38.1%) e 80 mesh (8.4%): tamanho total 0.177-1.000 mm, tamanho de partícula médio de 0.68 mm.

## 2.2. Extração assistida por ultrassom com líquidos pressurizados

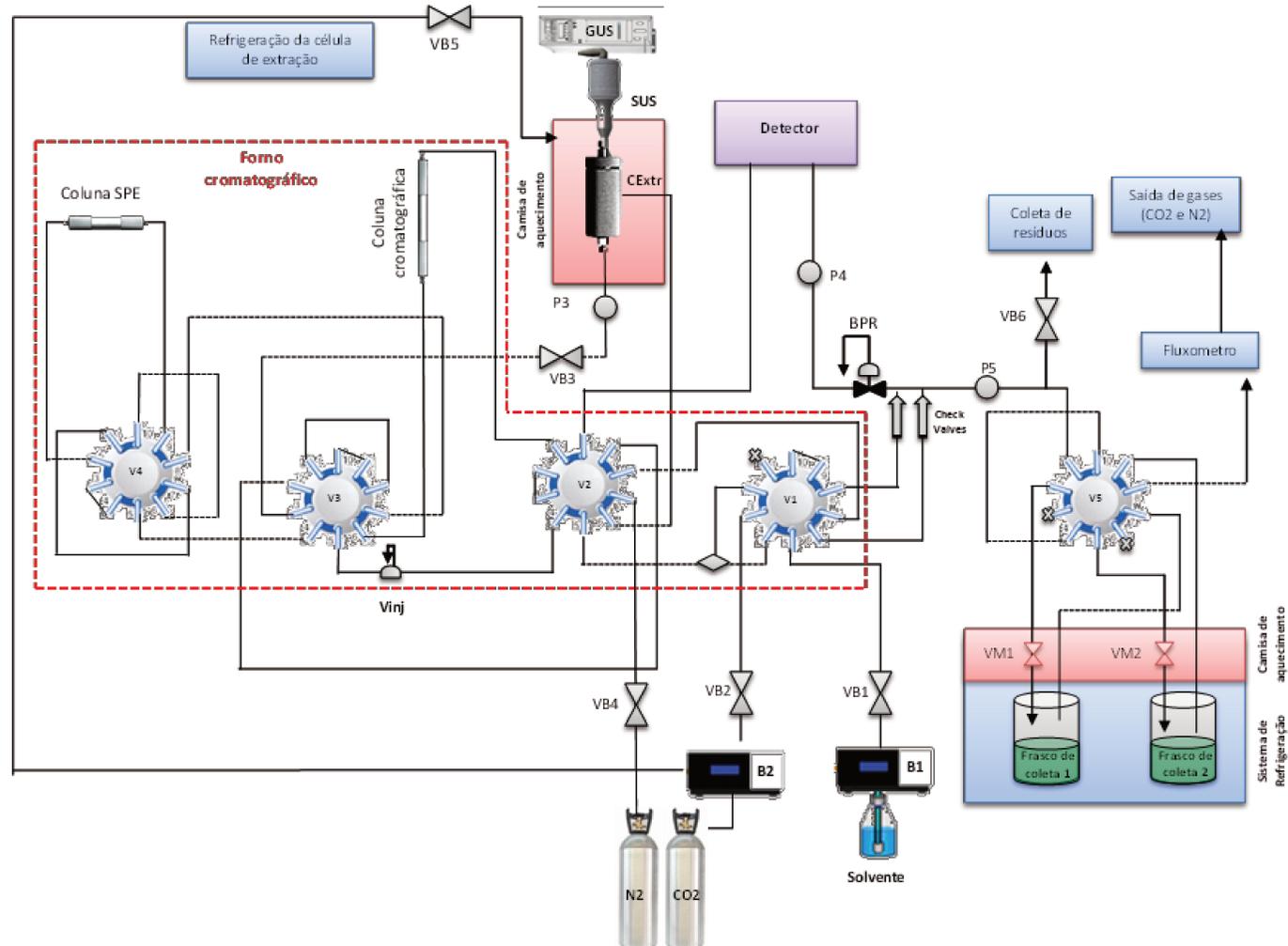
As extrações assistidas por ultrassom com líquidos pressurizados foram realizadas no sistema “EXTRACT-US” (**Figuras 6 e 7**) (FAPESP 2013/043044 – patente pendente), composto por uma bomba de líquidos (PU2080, Jasco, Japão), unidade gradiente ternária (LG 2080-2, Jasco), desgaseificador em linha (DG 2080-55, Jasco), detector UV-VIS (UV-7075, Jasco), cinco válvulas automáticas de duas posições de 10 portas (Waters Corporation, Milford MA, Estados Unidos), uma célula de extração de aço inoxidável de 10 mL acoplada ao ultrassom (800 W, 19 kHz, 13 mm de diâmetro, Unique Group, Indaiatuba, Brasil), válvula reguladora de contrapressão (série TESCO 26-1700) e válvulas de bloqueio (Autoclave Engineers, Erie, EUA).

**Figura 6** - Sistema integrado “EXTRACT-US”.



Os diversos empacotamentos das células de extração (**Figura 8**) foram feitos de maneira padronizada. O papel de filtro foi colocado no fundo da célula de extração sobre o filtro de aço inoxidável. Sequencialmente, camadas de lã de vidro (0.3 g), bolas de vidro de 3 mm de diâmetro (5.0 g), amostra da casca de romã seca (1.0 g) e camada de lã de vidro (0.1 g) foram colocadas dentro da célula de extração. Depois disso, a célula de extração foi acoplada à sonda de ultrassom. Um ciclo de extração consistiu em encher a célula de extração com o solvente selecionado (água, etanol + água 30, 50 e 70% v:v) até a pressão atingir 10 MPa.

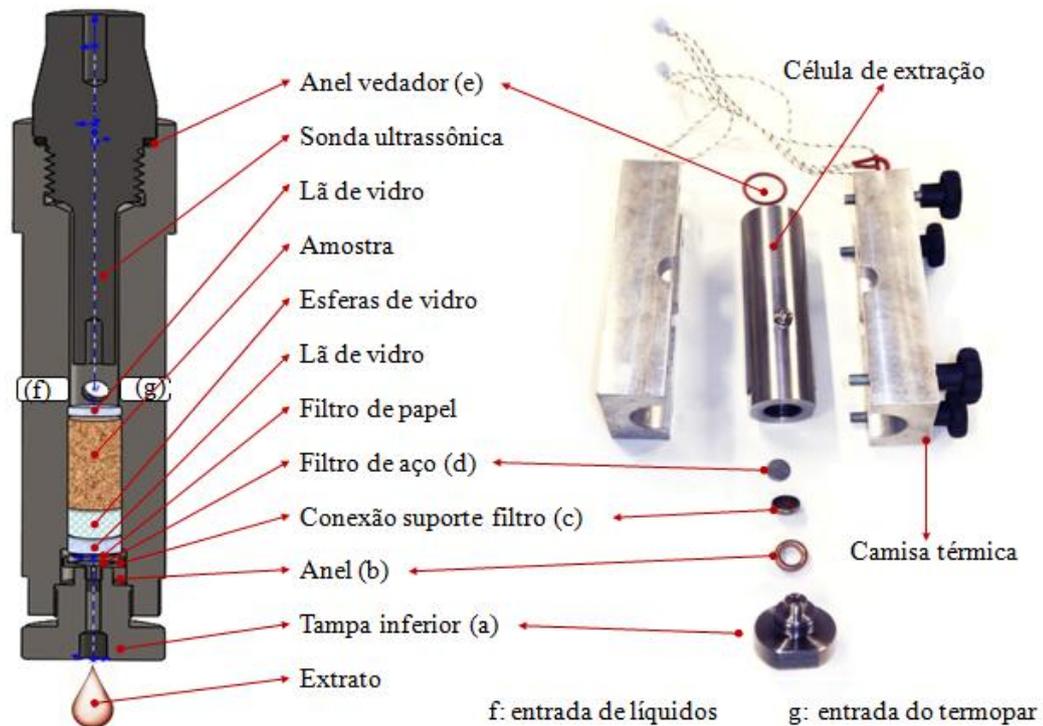
**Figura 7** - Diagrama do sistema integrado de análise Extract-US.



B1: Bomba de líquidos; B2: Bomba de CO<sub>2</sub>; BPR: Válvula reguladora de pressão; CExtr. Célula de extração, GUS: Gerador de ultrassom; SPE: Extração em fase sólida; SUS: Sonda de ultrassom; P1-5: Transdutor de pressão; V1-5: Válvula automática de 2 posições e 10 portas; VB1-6: Válvula de bloqueio; Vinj: Válvula de injeção manual; VM1-2: Válvula micrométrica; \*A seção pontilhada representa o forno cromatográfico.

A bomba foi ajustada para o modo de pressão constante a 10 MPa e o aquecimento da célula de extração iniciado até atingir a temperatura experimental (de 50 a 100 °C). O tempo de pré-aquecimento foi de 10 minutos. Quando o tempo de pré-aquecimento acabou, o ultrassom foi ligada durante 10 minutos na potência de ultrassom experimental (de 0 a 800 W no gerador). Em seguida, o ultrassom foi desligado e a célula de extração lavada durante 5 minutos (mantendo a pressão constante em 10 Mpa), e o extrato foi coletado em um frasco de vidro de 40 mL. Posteriormente, a célula de extração foi despressurizada. Em torno de 20 mL de amostra foi coletado em cada extração ou ciclo. Cada ciclo de extração teve duração de aproximadamente 30 minutos. Os extratos foram filtrados através de filtros de náilon (25 mm de diâmetro e poro de 0.20  $\mu\text{m}$ , Analítica, São Paulo, Brasil) e armazenados em frascos de vidro âmbar, mantidos a -20 °C, protegidos da luz até serem analisados.

**Figura 8** - Diagrama da célula de extração com ultrassom do sistema Extract-US.



Inicialmente, os extratos foram obtidos usando diferentes temperaturas (50, 60, 70, 80, 90 e 100 ± 1 °C) e solventes (água pura [A], misturas com etanol 30 [B], 50 [C] e 70% [D] v:v) utilizando 400 W de potência de ultrassom e um ciclo de extração. Posteriormente, a influência da potência de ultrassom (0, 160, 320, 480, 640 e 800 W no gerador) e o tamanho de partícula (tamanho médio de partícula de 0.68 e 1.05 mm) foram analisados usando a temperatura e o solvente adequados. Finalmente, o processo de extração foi monitorado por cinco ciclos consecutivos, testando ambos tamanhos de partícula (0.68 mm e 1.05 mm), sem ultrassom e também com ultrassom na potência otimizada. Uma vez que a temperatura, o solvente, a potência do ultrassom, o tamanho das partículas e o número de ciclos adequados foram definidos, a repetibilidade do método foi determinada (n=5).

A potência ultrassônica transmitida ao meio de extração foi calculada com base na dissipação de calor na água usando a seguinte equação [81]:

$$Power (W) = \left( \frac{dT}{dt} \right) * cp * M$$

Onde: “dT/dt” representa o aumento da temperatura em Graus Celsius por segundo, “cp” é a capacidade térmica da água (4.2 J.g<sup>-1</sup>) e “M” é a massa da água em gramas.

A potência do ultrassom foi calculada com base no aumento de temperatura monitorado por um termopar imerso em 200 mL de água na meia altura. A potência transmitida na ponta da sonda foi estimada em 38.5 ± 1.3 W (n=5) quando o gerador de ultrassom foi ajustado para 800 W (~4.8%). Portanto, quando o gerador foi ajustado para 0, 160, 320, 480, 640 e 800 W, a energia de ultrassom estimada transmitida ao meio foi 0, 7.7, 15.4, 23.1, 30.8 e 38.5 W, respectivamente.

### 2.3. Microscopia eletrônica de varredura

Amostras da casca de romã desidratadas e amostras após o processo de extração sem ultrassom (PLE) e com ultrassom (UAPLE) foram armazenadas em freezer e enviadas ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da Central Analítica do Instituto de Química da Unicamp. As imagens de superfície das três amostras da casca de romã foram obtidas através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) no equipamento JSM 6360-LV, aceleração de 30 KeV, resolução - 3nm, EDS - Noran System Six e ampliação de x500 e x1000.

## 2.4. Análise estatística

PCF (Principais Compostos Fenólicos:  $\alpha$  punicalagin ( $\alpha$ -pun),  $\beta$  punicalagin ( $\beta$ -pun), ácido elágico-hex (AE-hex) e ácido elágico (AE)); OCF (Outros Compostos Fenólicos: ácido elágico-pent (AE-pent), ácido elágico-deoxihex (EA-deoxyhex), pedunculagina I (Pedun-I) e os compostos não identificados) e POCF (PCF + OCF) foram considerados nos cálculos estatísticos.

Todas as variáveis foram submetidas a um teste de conformidade para verificar a aproximação com curvas teóricas. Para isso, utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov e o teste Levene para verificar a homoscedasticidade. O desenho da abordagem experimental foi conduzido para observar o efeito principal e a interação de diferentes variáveis. Dois experimentos foram conduzidos: a) 46 experimentos com diferentes solventes (água, 30%, 50% ou 70% etanol) e temperaturas (50, 60, 70, 80, 90, 100 °C) com rendimento de POCF (mg/g as) como variável dependente; b) 26 fatorial com diferentes tamanhos de partículas (grandes e pequenas) e potência de ultrassom (0, 160, 320, 480, 640, 800 W) com rendimento de POCF (mg/g as) como variável dependente. Para comparar a extração de PCF e POCF entre partículas grandes e pequenas, foi utilizado o teste t de Student.

A ANOVA unidirecional com teste post hoc Tukey HSD foi utilizada para comparar a extração entre o tamanho da partícula (grande ou pequeno) considerando a presença (480 W) ou ausência de ultrassom (0 W) durante os cinco ciclos de extração. Foram realizados cinco ANOVA de sentido único considerando a soma POCF extraída por ciclo (1 a 5) em quatro possibilidades: partícula pequena (0.68 mm) com e sem ultrassom; partícula grande (1.05 mm) com e sem ultrassom. Para determinar uma correlação linear entre os diferentes parâmetros analisados, o coeficiente de correlação de Pearson (r) foi calculado. Em todos os testes, considerou-se o nível de significância de  $p < 0.05$  e foi utilizado o Pacote Estatístico para Ciências Sociais (SPSS) versão 15.0.1.

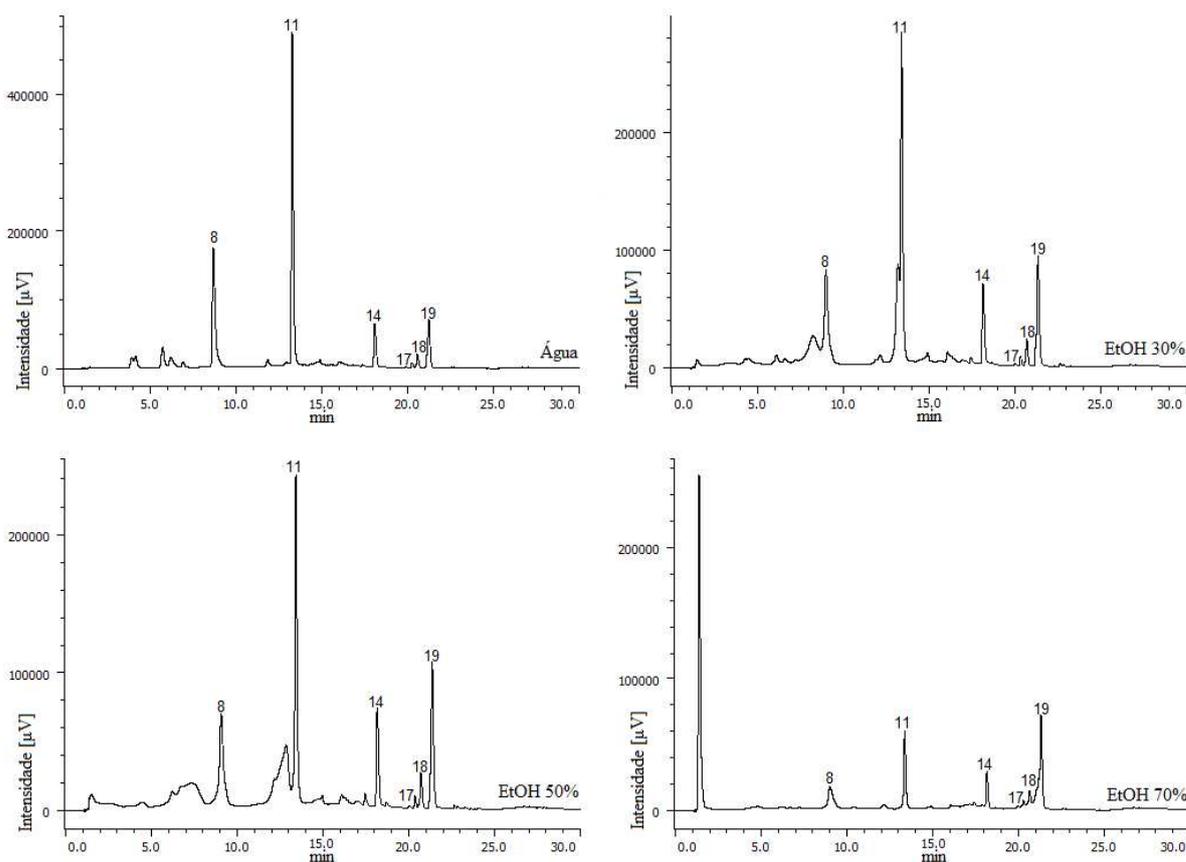
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar a influência das principais variáveis de extração no processo, as extrações foram inicialmente realizadas com diferentes temperaturas (50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C) e solventes (Água, EtOH 30%, EtOH 50% e EtOH 70%), mantendo a potência de ultrassom constante a 400 W. A **Tabela 6** apresenta o rendimento de

extração (mg/g de amostra em base seca) de PCF e POCF. Os compostos 1 a 11 foram expressos como equivalentes de punicalagina, e os compostos 12 a 20 foram expressos como equivalentes de ácido elágico. A **Figura 9** apresenta os cromatogramas representativos dos extratos da casca de romã (absorbância monitorada a 370 nm) usando solventes A, B, C e D.

O modelo de planejamento fatorial foi significativo ( $P < 0.001$ ), com efeito principal do solvente ( $F = 8203.86$ ;  $p < 0.001$ ), temperatura ( $F = 111.91$ ;  $p < 0.001$ ) e com interação entre solvente e temperatura ( $F = 160.39$ ;  $p < 0.001$ ). A interação é clara na **Figura 10**, especialmente no ponto de 70 °C usando água (interação positiva) e usando EtOH 70% (interação negativa).

**Figura 9** - Cromatogramas representativos a 370 nm dos extratos da casca de romã usando solventes A, B, C e D.

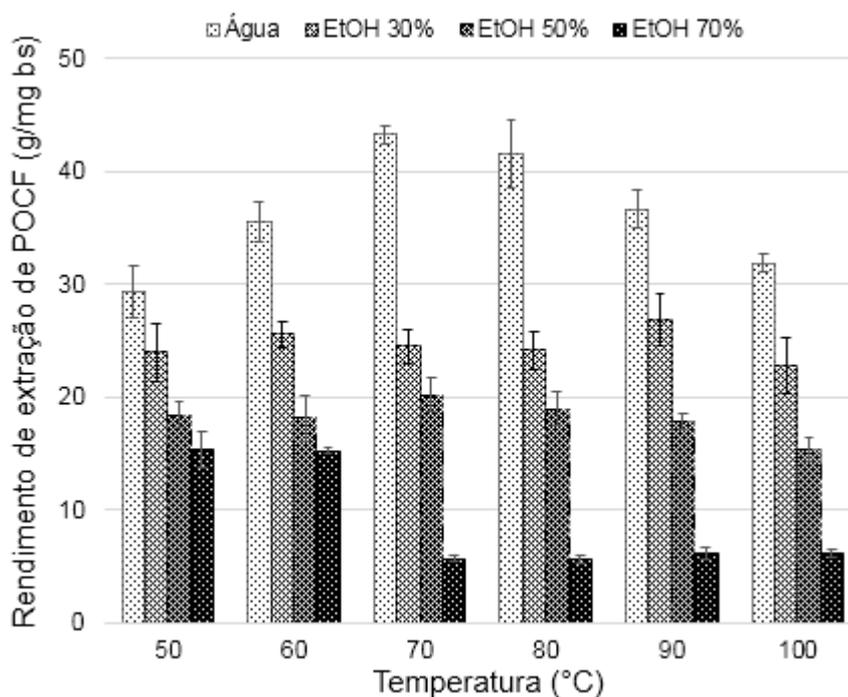


**Tabela 6** - Rendimento de extração de compostos fenólicos de extratos da casca de romã usando diferentes solventes de extração e temperaturas por UAPLE

Solvente	T (°C)	Rendimento de extração (mg/g bs)				
		$\alpha$ -pun	$\beta$ -pun	EA-hex	EA	POCF*
Água (MPOC: 36.35 ± 5.39 mg/g bs)	50	7.98 ± 0.68 <sup>a,B</sup>	16.55 ± 1.28 <sup>a,C</sup>	0.52 ± 0.05 <sup>a,A</sup>	0.64 ± 0.02 <sup>a,A</sup>	29.29 ± 2.32 <sup>a,C</sup>
	60	9.09 ± 0.57 <sup>ab,C</sup>	20.62 ± 0.97 <sup>b,C</sup>	0.63 ± 0.04 <sup>b,B</sup>	0.80 ± 0.05 <sup>b,A</sup>	35.49 ± 1.81 <sup>bc,C</sup>
	70	11.48 ± 0.21 <sup>d,C</sup>	24.55 ± 0.61 <sup>c,D</sup>	0.79 ± 0.01 <sup>c,B</sup>	1.10 ± 0.04 <sup>c,B</sup>	43.27 ± 0.76 <sup>d,D</sup>
	80	10.30 ± 0.73 <sup>c,C</sup>	24.04 ± 1.84 <sup>c,D</sup>	0.80 ± 0.06 <sup>c,B</sup>	1.09 ± 0.05 <sup>c,B</sup>	41.52 ± 3.03 <sup>d,D</sup>
	90	10.18 ± 0.25 <sup>bc,D</sup>	20.36 ± 1.31 <sup>b,D</sup>	0.69 ± 0.02 <sup>b,B</sup>	0.87 ± 0.13 <sup>b,A</sup>	36.64 ± 1.71 <sup>c,D</sup>
	100	8.16 ± 0.37 <sup>a,C</sup>	17.37 ± 0.61 <sup>a,D</sup>	0.64 ± 0.02 <sup>b,B</sup>	1.10 ± 0.06 <sup>c,A</sup>	31.90 ± 0.79 <sup>ab,D</sup>
EtOH 30% (MPOC: 24.64 ± 1.41 mg/g bs)	50	5.69 ± 0.74 <sup>a,A</sup>	14.79 ± 1.34 <sup>a,C</sup>	0.66 ± 0.03 <sup>a,B</sup>	0.84 ± 0.13 <sup>a,B</sup>	23.99 ± 2.54 <sup>a,B</sup>
	60	5.82 ± 0.21 <sup>a,B</sup>	15.83 ± 0.66 <sup>a,B</sup>	0.72 ± 0.04 <sup>ab,B</sup>	1.09 ± 0.06 <sup>ab,B</sup>	25.58 ± 1.14 <sup>a,B</sup>
	70	5.88 ± 0.42 <sup>a,B</sup>	14.78 ± 1.05 <sup>a,C</sup>	0.78 ± 0.06 <sup>ab,B</sup>	1.10 ± 0.11 <sup>ab,B</sup>	24.47 ± 1.55 <sup>a,C</sup>
	80	5.51 ± 0.42 <sup>a,B</sup>	14.74 ± 1.00 <sup>a,C</sup>	0.77 ± 0.08 <sup>ab,B</sup>	1.15 ± 0.16 <sup>b,B</sup>	24.12 ± 1.74 <sup>a,C</sup>
	90	6.05 ± 0.65 <sup>a,C</sup>	16.42 ± 1.20 <sup>a,C</sup>	0.83 ± 0.05 <sup>b,C</sup>	1.20 ± 0.23 <sup>b,B</sup>	26.88 ± 2.34 <sup>a,C</sup>
	100	4.96 ± 0.38 <sup>a,B</sup>	14.15 ± 1.82 <sup>a,C</sup>	0.74 ± 0.04 <sup>ab,C</sup>	1.05 ± 0.08 <sup>ab,A</sup>	22.83 ± 2.51 <sup>a,C</sup>
EtOH 50% (MPOC: 18.14 ± 1.61 mg/g bs)	50	5.20 ± 0.33 <sup>ab,A</sup>	10.19 ± 0.61 <sup>b,B</sup>	0.75 ± 0.03 <sup>ab,B</sup>	0.97 ± 0.05 <sup>a,B</sup>	18.43 ± 1.12 <sup>b,A</sup>
	60	5.65 ± 0.52 <sup>bc,B</sup>	9.62 ± 1.27 <sup>ab,A</sup>	0.72 ± 0.07 <sup>ab,B</sup>	1.04 ± 0.13 <sup>a,B</sup>	18.10 ± 2.03 <sup>ab,A</sup>
	70	6.21 ± 0.56 <sup>c,B</sup>	10.48 ± 0.96 <sup>b,B</sup>	0.78 ± 0.08 <sup>b,B</sup>	1.03 ± 0.23 <sup>a,AB</sup>	20.20 ± 1.45 <sup>b,B</sup>
	80	5.21 ± 0.27 <sup>ab,B</sup>	10.32 ± 0.85 <sup>b,B</sup>	0.76 ± 0.04 <sup>ab,B</sup>	1.08 ± 0.10 <sup>a,B</sup>	18.96 ± 1.46 <sup>b,B</sup>
	90	4.62 ± 0.24 <sup>a,B</sup>	9.48 ± 0.47 <sup>ab,B</sup>	0.70 ± 0.04 <sup>ab,B</sup>	1.08 ± 0.07 <sup>a,AB</sup>	17.81 ± 0.70 <sup>ab,B</sup>
	100	4.46 ± 0.33 <sup>a,B</sup>	8.03 ± 0.62 <sup>a,B</sup>	0.65 ± 0.02 <sup>a,B</sup>	1.05 ± 0.17 <sup>a,A</sup>	15.34 ± 1.08 <sup>a,B</sup>
EtOH 70% (MPOC: 9.00 ± 4.84 mg/g bs)	50	4.59 ± 0.78 <sup>b,A</sup>	7.76 ± 0.64 <sup>b,A</sup>	0.50 ± 0.06 <sup>b,A</sup>	1.15 ± 0.06 <sup>cd,C</sup>	15.28 ± 1.61 <sup>b,A</sup>
	60	4.14 ± 0.19 <sup>b,A</sup>	8.12 ± 0.28 <sup>b,A</sup>	0.50 ± 0.01 <sup>b,A</sup>	1.28 ± 0.09 <sup>d,C</sup>	15.21 ± 0.26 <sup>b,A</sup>
	70	1.99 ± 0.16 <sup>a,A</sup>	0.92 ± 0.10 <sup>a,A</sup>	0.06 ± 0.04 <sup>a,A</sup>	0.77 ± 0.05 <sup>a,A</sup>	5.67 ± 0.30 <sup>a,A</sup>
	80	1.95 ± 0.11 <sup>a,A</sup>	0.93 ± 0.09 <sup>a,A</sup>	0.08 ± 0.02 <sup>a,A</sup>	0.80 ± 0.08 <sup>a,A</sup>	5.61 ± 0.34 <sup>a,A</sup>
	90	2.07 ± 0.18 <sup>a,A</sup>	0.98 ± 0.06 <sup>a,A</sup>	0.11 ± 0.04 <sup>a,A</sup>	0.90 ± 0.07 <sup>ab,AB</sup>	6.06 ± 0.52 <sup>a,A</sup>
	100	2.03 ± 0.14 <sup>a,A</sup>	1.07 ± 0.06 <sup>a,A</sup>	0.09 ± 0.04 <sup>a,A</sup>	1.07 ± 0.10 <sup>bc,A</sup>	6.14 ± 0.38 <sup>a,A</sup>

\*POCF: Soma de todos os compostos fenólicos extraídos da casca de romã; MPOCF: Média de POCF de todas as temperaturas no mesmo solvente; Resultados expressos como média ± desvio padrão (DP); bs: amostra em base seca; Resultados com letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as temperaturas com o mesmo solvente, a 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey; Resultados com letras maiúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre os solventes com a mesma temperatura, a 5% de significância, segundo o teste de Tukey.

**Figura 10** - Gráfico do rendimento de extração de POCF usando diferentes temperaturas e solventes.



POCF: Soma de todos os compostos fenólicos extraídos da casca de romã; bs: amostra em base seca; Resultados com letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as temperaturas com o mesmo solvente, a 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey; Resultados com letras maiúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre os solventes com a mesma temperatura, a 5% de significância, segundo o teste de Tukey.

### 3.1. Efeito da temperatura de extração e solvente

Os resultados da ANOVA bidirecional demonstram que a temperatura, o solvente e a interação entre esses dois fatores influenciaram significativamente na extração de compostos fenólicos. Diferenças significativas foram observadas no conteúdo de PCF e POCF, dependendo da temperatura e do solvente. A maior MPOCF (Média de POCF para o mesmo solvente) foi observada usando solvente de extração de água, de  $36.35 \pm 5.39$  mg/g bs. O rendimento de MPOCF utilizando água como solvente de extração foi de 47.5%, 100.4% e 303.9% superior ao rendimento de MPOCF utilizando EtOH 30%, 50% e 70%, respectivamente. O ajuste para comparações múltiplas foi calculado pelo método de Bonferroni, assumindo que a diferença média é significativa quando  $p < 0.05$ . Foi possível verificar que as condições de extração que proporcionaram maiores rendimentos de compostos polares ( $\alpha$ -pun e  $\beta$ -pun) foram diferentes daquelas mais adequadas para a extração de compostos moderadamente polares, como o EA e derivados. Independentemente da

temperatura, o solvente de extração de água forneceu os maiores rendimentos de  $\alpha$ -pun e  $\beta$ -pun.

À medida que a porcentagem de etanol do solvente aumentou, o rendimento de extração desses compostos polares diminuiu. Tais resultados são esperados porque a medida que a porcentagem de etanol no solvente aumenta, a polaridade do solvente e a solubilidade dos compostos hidrofílicos no solvente diminuem. O maior rendimento de EA-hex foi observado utilizando EtOH a 30% a 90 °C, e os piores rendimentos foram observados utilizando EtOH a 70% entre 70 e 100 °C. O maior rendimento de EA foi observado ao utilizar EtOH 70% entre 50 e 60 °C, e os piores rendimentos variaram muito de acordo com a temperatura e o solvente de extração utilizado no processo. Estes resultados estão possivelmente associados às diferenças significativas de polaridade dos compostos presentes nas cascas de romã, variando de polar (punicalagina e derivados) a moderadamente polar (ácido elágico e derivados) que, por sua vez, afeta a capacidade do solvente de extraí-los da matriz da amostra. Considerando que  $\alpha$ -pun e  $\beta$ -pun foram os fenólicos predominantes na casca da romã, a concentração no extrato de tais compostos foi um dos fatores mais importantes na escolha do solvente.

Na maioria dos casos estudados, a temperatura influenciou as quantidades extraídas de PCF e POCF. Utilizando água, as temperaturas mais adequadas para a extração do POCF foram entre 70 e 80 °C; não houve diferença estatística com EtOH 30%; utilizando EtOH 50% entre 50 e 90 °C, e utilizando EtOH a 70% entre 50 e 60 °C. O maior rendimento de POCF foi obtido usando extração com solvente de água a 70 °C, fornecendo  $43.27 \pm 0.76$  mg de compostos fenólicos/g bs. Considerando apenas as extrações realizadas com solvente água, foi possível extrair 32.3% e 26.3% a mais de POCF a 70 °C do que a 50 °C e a 100 °C, respectivamente.

Estas observações estão provavelmente associadas a uma combinação de efeitos: temperatura, fenômenos de cavitação, viscosidade, constante dielétrica, solubilidade dos compostos no solvente, transferência de massa e degradação dos compostos alvo. O aumento da temperatura reduz a constante dielétrica dos solventes modificando suas características químicas e sua capacidade de extrair os compostos fenólicos presentes na amostra. À medida que a temperatura aumenta, a viscosidade diminui, afetando sua penetração nos poros da matriz da amostra. Também aumenta a solubilidade dos compostos fenólicos no solvente, mas também pode promover a sua degradação térmica durante o processo de extração.

A temperatura também afeta a cavitação acústica e a difusão através das paredes celulares. Ambos os fenômenos podem ser significativamente aumentados pela temperatura de extração. Com o aumento da temperatura, a tensão superficial e a viscosidade do meio líquido são reduzidas, e a pressão de vapor do líquido é aumentada, aumentando a formação de bolhas de cavitação no meio líquido e produzindo cavitação ultrassônica na menor intensidade da onda ultrassônica [69].

Em geral, 100 °C não foi adequado para a extração de PCF e POCF das cascas de romã, uma vez que os menores rendimentos de extração foram observados. É provável que a 100 °C compostos termolábeis fenólicos tenham sido degradados devido à temperatura muito alta. Há evidências de que vários compostos fenólicos não são completamente estáveis em altas temperaturas usadas para processos de PLE [17][33][34][82][83]. Na maioria dos casos, a temperatura de extração pode ser aumentada até um limite, o que é alcançado quando a degradação/oxidação dos compostos alvo ultrapassa o aumento da transferência de massa promovida por temperaturas mais altas no processo. No caso específico de cascas de romã sendo extraídas por PLE, foi sugerido que a temperatura de extração não deve ser superior a 40 °C, caso contrário reduziria a capacidade de eliminação de radicais livres e o conteúdo fenólico total do extrato produzido [17].

Além da degradação térmica, o fenômeno de cavitação pode ter influenciado na redução dos níveis de compostos fenólicos nas extrações realizadas a 100 °C. Temperaturas mais altas reduzem a cavitação, uma vez que os vazios das bolhas são preenchidos com vapores de solvente, levando a um colapso menos violento. No entanto, a baixa temperatura, a pressão de vapor do solvente é baixa e permite que as bolhas de cavitação colidam violentamente na matriz da amostra, levando a um aumento na área superficial e, conseqüentemente, melhora na transferência de massa através da turbulência e transmissão [35].

No entanto, é importante notar que pode existir uma interação entre o solvente e a temperatura. Os resultados indicam que as melhores temperaturas variam dependendo do solvente utilizado. Por exemplo, no caso de  $\alpha$ -pun: usando água, o maior rendimento foi observado a 70 °C; usando EtOH 30%, não houve diferenças nos resultados; utilizando etanol 50%, os maiores rendimentos foram observados a 60 e 70 °C; e utilizando EtOH 70%, os maiores rendimentos foram observados a 50 e 60 °C. Estas diferenças podem ser explicadas pela modificação da temperatura das propriedades do solvente, tais como viscosidade e constante

dielétrica, e na solubilidade dos compostos fenólicos no solvente. Mais importante, as propriedades dos solventes são afetadas diferentemente pela temperatura. Ilustrativamente, a redução da constante dielétrica da água pelo aumento da temperatura de 50 a 100 °C será significativamente maior que a redução da constante dielétrica do etanol com o mesmo aumento de temperatura. A constante dielétrica do solvente afeta sua capacidade de solubilizar os compostos da matriz da amostra e, portanto, pode afetar o rendimento da extração [82].

Outro fator que pode estar envolvido na interação entre temperatura e solvente de extração é a viscosidade. Diferenças na viscosidade de ambos os solventes foram menores a 100 °C do que a 50 °C, sendo a viscosidade do etanol de aproximadamente 20% maior que a da água. A viscosidade do solvente está relacionada à difusividade através dos poros da amostra, o que pode afetar o processo de extração. À medida que a temperatura aumenta, as mudanças na viscosidade dos solventes testados não são as mesmas, influenciando diferentemente sua penetração na matriz da amostra e, portanto, afetando o rendimento da extração. A viscosidade do solvente também pode afetar a propagação de ondas ultrassônicas no solvente e os rendimentos de extração.

O ponto de ebulição do solvente também será um importante parâmetro para a cavitação e, portanto, afetará o processo de extração e a interação entre temperatura e solvente. Quando a temperatura do solvente está próxima do seu ponto de ebulição ou é muito menor, a cavitação relativa será menos intensa do que usando temperaturas intermediárias. Para a água, a maior cavitação relativa é observada entre 50 e 60 °C, que pode ser 2-3 vezes maior que a 100 °C [82]. Como os solventes de extração e suas misturas possuem diferentes pontos de ebulição, haverá diferenças na cavitação relativa alcançada com esses solventes em diferentes temperaturas. Esta é uma questão complexa, uma vez que o ponto de ebulição dos solventes muda a alta pressão, o que também deve ser considerado.

A combinação de ultrassom, diferentes solventes e temperaturas para a extração de compostos específicos a partir de amostras complexas, como a casca da romã, é uma tarefa desafiadora, na qual uma combinação de inúmeras variáveis podem influenciar o rendimento de extração.

### 3.2. Efeito da potência de ultrassom, tamanho de partícula e número de ciclos

Com base nos resultados anteriores, para estudar o efeito da potência de ultrassom e do tamanho de partícula no processo de extração, a água foi selecionada como solvente e as extrações foram realizadas a 70 °C, pois estas foram as condições que maximizaram o rendimento de extração de todos os fenólicos. A **Tabela 7** apresenta os rendimentos de extração de PCF e POCF obtidos utilizando diferentes potências de ultrassom (0 a 800 W) e tamanhos de partícula (1.05 e 0.68 mm). A **Figura 11** apresenta o gráfico do rendimento de extração de POCF usando diferentes potências de ultrassom e tamanhos de partículas.

Os resultados apresentados na **Tabela 7** indicam que a MPOCF de partículas pequenas (0.68 mm) é 66.2% superior a MPOCF de partículas grandes (1.05 mm). Tal comportamento é esperado, uma vez que a área maior de contato relativa nas partículas pequenas permite aumentar a transferência de massa dos compostos alvo da matriz da amostra para o solvente. Em contraste, a área de contato relativa entre a matriz da amostra e o solvente é menor em partículas grandes, diminuindo a taxa de transferência de massa [37]. É importante ressaltar que, embora tenham sido observados rendimentos de extração mais elevados com o uso de amostras pequenas, o entupimento de linhas de solventes foi frequente e exigiu constantemente que o processo de extração fosse abortado e repetido. Portanto, o uso de partículas pequenas não é recomendado.

Observou-se que a potência de ultrassom não teve efeito sobre a extração de QPC e POCF usando partículas pequenas. Em contraste, o efeito da potência de ultrassom foi evidente quando aplicado em partículas grandes. O maior POCF foi observado com o uso de potência ultrassônica de 480 e 640 W ( $27.18 \pm 1.17$  e  $30.27 \pm 2.22$  mg/g bs, respectivamente), que em média foi 23% superior ao POCF sem o uso do ultrassom e estatisticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ). Em geral, 480 e 640 W foram as melhores potências para extrair POCF de partículas grandes. Acredita-se que o aumento no rendimento fenólico total se deva principalmente à melhor cavitação e ao efeito mecânico do ultrassom, que aumenta a área de superfície de contato entre as fases sólida e líquida, aumenta a penetração do solvente na matriz e acelera a transferência de massa dos analitos ao solvente [39].

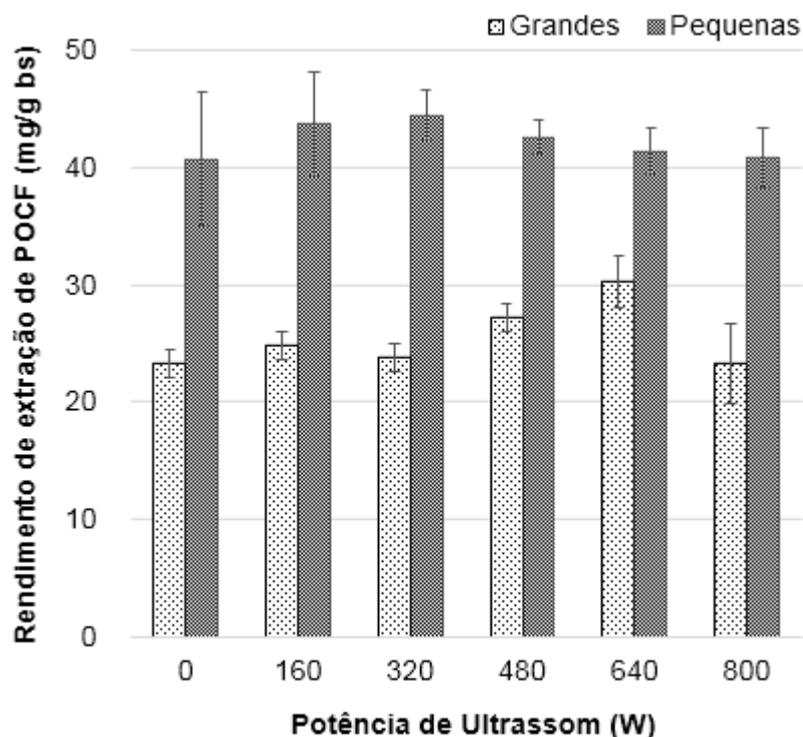
**Tabela 7** - Rendimento de extração de compostos fenólicos de extratos da casca de romã usando diferentes potência de ultrassom e tamanho de partícula.

Tamanho de partícula	U (W)	Rendimento de extração (mg/g bs)				
		$\alpha$ -pun	$\beta$ -pun	EA-hex	EA	POCF*
Grande 1.05 mm† (MPOCF: 25.46 ± 2.77 mg/g bs)	0	5.37 ± 0.35 <sup>ab</sup>	12.93 ± 1.04 <sup>a</sup>	0.38 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.54 ± 0.04 <sup>a</sup>	23.30 ± 1.19 <sup>a</sup>
	160	5.60 ± 0.30 <sup>ab</sup>	13.88 ± 1.04 <sup>a</sup>	0.41 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.57 ± 0.04 <sup>a</sup>	24.86 ± 1.19 <sup>ab</sup>
	320	5.44 ± 0.38 <sup>ab</sup>	13.28 ± 1.07 <sup>a</sup>	0.39 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.05 <sup>a</sup>	23.85 ± 1.21 <sup>ab</sup>
	480	6.07 ± 0.51 <sup>ab</sup>	14.89 ± 0.93 <sup>ab</sup>	0.45 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.71 ± 0.08 <sup>b</sup>	27.18 ± 1.17 <sup>bc</sup>
	640	6.85 ± 0.51 <sup>c</sup>	16.82 ± 1.28 <sup>b</sup>	0.50 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.72 ± 0.09 <sup>b</sup>	30.27 ± 2.22 <sup>c</sup>
	800	5.22 ± 0.48 <sup>b</sup>	12.95 ± 2.21 <sup>a</sup>	0.39 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.11 <sup>a</sup>	23.33 ± 3.40 <sup>ab</sup>
Pequeno 0.68 mm† (MPOCF: 42.32 ± 1.57 mg/g bs)	0	9.33 ± 1.34 <sup>a</sup>	22.46 ± 3.38 <sup>a</sup>	0.68 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.02 ± 0.18 <sup>a</sup>	40.77 ± 5.67 <sup>a</sup>
	160	9.87 ± 1.02 <sup>a</sup>	24.46 ± 2.91 <sup>a</sup>	0.70 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.06 ± 0.13 <sup>a</sup>	43.73 ± 4.43 <sup>a</sup>
	320	10.20 ± 0.65 <sup>a</sup>	24.41 ± 1.71 <sup>a</sup>	0.74 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.12 ± 0.06 <sup>a</sup>	44.54 ± 2.20 <sup>a</sup>
	480	8.85 ± 0.58 <sup>a</sup>	24.64 ± 0.71 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.03 <sup>a</sup>	42.64 ± 1.39 <sup>a</sup>
	640	9.20 ± 0.66 <sup>a</sup>	22.99 ± 1.91 <sup>a</sup>	0.69 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.02 ± 0.06 <sup>a</sup>	41.42 ± 1.97 <sup>a</sup>
	800	8.94 ± 0.52 <sup>a</sup>	22.73 ± 1.90 <sup>a</sup>	0.68 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.06 <sup>a</sup>	40.85 ± 2.55 <sup>a</sup>

\*POCF: Soma de todos os compostos fenólicos extraídos da casca de romã; MPOCF: Média POCF para o mesmo solvente; Resultados expressos como média ± desvio padrão (DP); bs: amostra em base seca; Mesma letra minúscula indica que não há diferença significativa entre as temperaturas utilizando o mesmo solvente, a 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey; A mesma letra maiúscula indica que não há diferença entre a extração por solvente na mesma temperatura, a 5% de significância, segundo o teste de Tukey.

Maiores potências de ultrassom podem promover a degradação dos compostos alvo. A aplicação de ultrassom em soluções aquosas pode gerar radicais livres a partir da dissociação da água, o que pode promover a oxidação de compostos e a quebra de ligações levando à modificação de estruturas macromoleculares e redução do peso molecular [84][85]. A via de biodegradação dos elagitaninos da romã consiste na conversão da punicalagina ([MH-] 1083) em punicalina ([MH-] 781), ácido galégico ([MH-] 601) e/ou EA ([MH-] 301 [86]. Embora a estabilidade dos compostos-alvo não tenha sido acessada neste estudo, é razoável supor que uma via similar possa ocorrer durante o UAPLE. Por exemplo, usando partículas grandes e potências entre 480 e 640 W, foram observadas maiores quantidades de EA-hex e EA, resultado que pode ter sido proveniente da degradação da punicalagina em EA e seus derivados. No entanto, rendimentos mais baixos podem estar associados à oxidação de fenólicos alvos, formando outros compostos que não foram analisados.

**Figura 11** - Gráfico do rendimento de extração de POCF usando diferentes potências de ultrassom e tamanho das partículas.



POCF: Soma de todos os compostos fenólicos extraídos da casca de romã; bs: amostra em base seca; Resultados com letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as temperaturas com o mesmo solvente, a 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey; Resultados com letras maiúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre os solventes com a mesma temperatura, a 5% de significância, segundo o teste de Tukey.

Adicionalmente, é importante notar que os produtos naturais são complexos e que as interações entre os compostos fenólicos e a estrutura da matriz podem influenciar nas reações de degradação causadas pelos radicais livres. Demonstrou-se que os fenólicos interagem com proteínas através de uma variedade de interações, incluindo pontes de hidrogênio, ligações iônicas e covalentes e interações hidrofóbicas [87] e, portanto, determinar a estabilidade dos compostos em amostras complexas durante a extração é um desafio.

Finalmente, as extrações foram realizadas utilizando partículas com diferentes tamanhos (1.05 e 0.68 mm), com e sem o auxílio de ultrassom (480 W), durante cinco ciclos consecutivos. Os resultados são mostrados na **Tabela 8**. O POCF acumulado (mg/g as) comparando o efeito do ultrassom, o tamanho das partículas e o número de ciclos é mostrado na **Figura 12**. O processo começa com um período de taxa de extração constante, caracterizado pela extração de compostos que estão prontamente disponíveis para o solvente. Quando esse soluto facilmente

acessível começa a se exaurir, a difusão intra-partícula torna-se o mecanismo impulsionador da transferência de massa. Então, as curvas de extração assumem a forma típica de uma curva de difusão, com taxa de extração reduzida. Diferenças significativas foram observadas no QPC e no POCF, dependendo de vários ciclos, da potência do ultrassom e do tamanho das partículas.

Utilizando pequenas partículas (0.68 mm) sem ultrassom, o processo de extração foi muito eficiente, sendo capaz de remover a maior parte dos fenólicos presentes (81.4%) em um ciclo, e atingir recuperação dos compostos quase completa após apenas três ciclos (99.3%). Nenhum composto foi detectado no quinto ciclo. Aplicando o ultrassom a pequenas partículas, foi necessário um ciclo a menos para extrair todos os compostos. No primeiro ciclo, a recuperação foi de 88.1% e no segundo ciclo foi de 99.7%. A extração com ultrassom foi mais rápida, no entanto, POCF acumulado com ultrassom foi 9.9% menor quando comparado ao POCF sem o uso de ultrassom.

Usando partículas grandes (1.05 mm), o ultrassom teve um impacto significativo na cinética de extração. Sem o auxílio do ultrassom, pequenas quantidades de fenólicos foram extraídas no primeiro ciclo (47.2%). No último ciclo, ainda foi possível extrair 3.8% dos fenólicos extraíveis. Aplicando o ultrassom a partículas grandes, foi necessário um ciclo a menos para extrair todos os compostos. No primeiro ciclo, a recuperação foi de 70.0%, no segundo ciclo foi de 92.9%, e nenhum dos compostos foi detectado no quinto ciclo. A extração com ultrassom foi mais rápida, mas POCF acumulado em cinco ciclos com ultrassom foi o mesmo quando comparado ao POCF sem o uso de ultrassom.

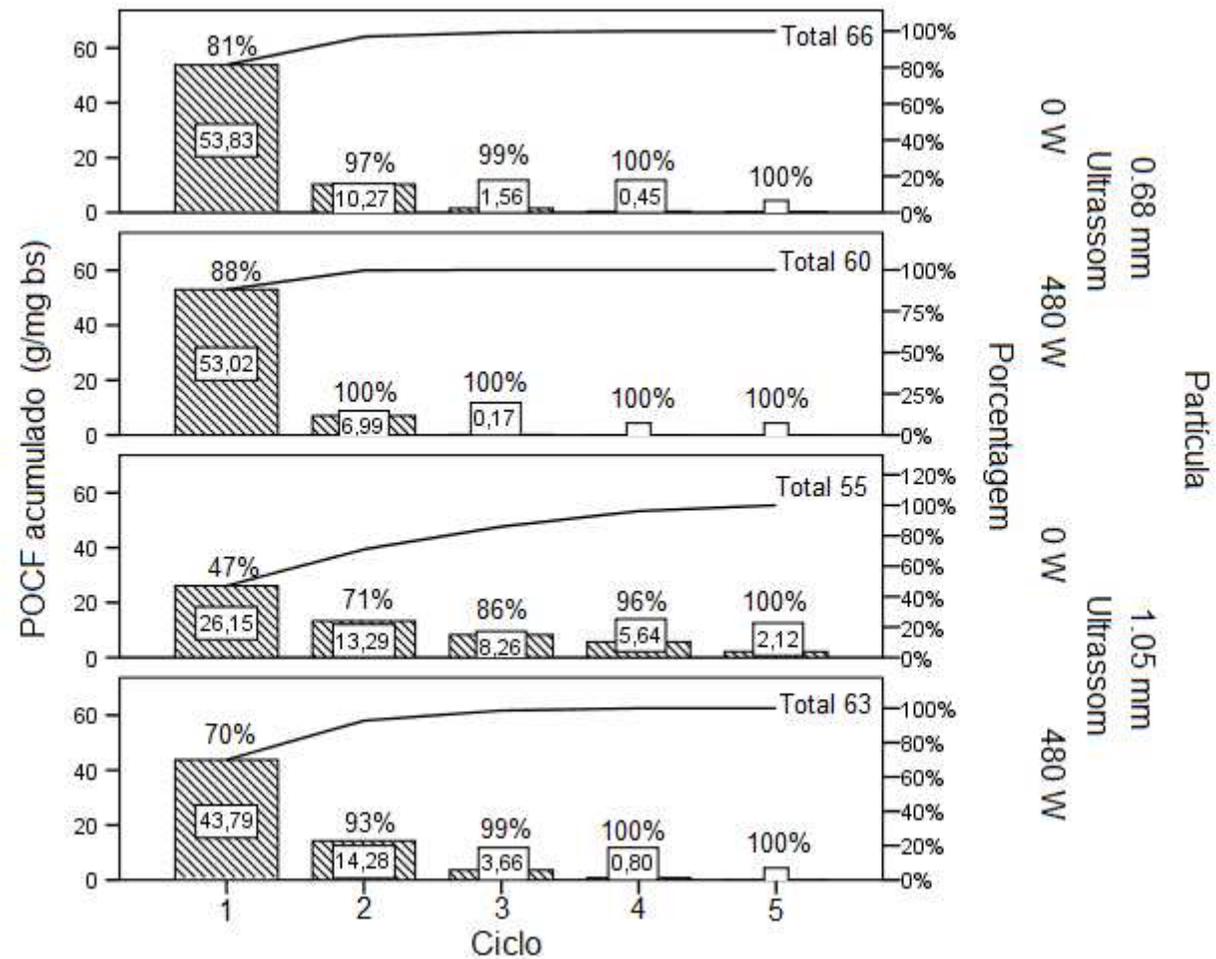
Para amostras de partículas grandes, as curvas de cinética de extração indicam que a difusão é um fator importante e que o ultrassom reduz o tempo de extração e diminui os problemas de entupimento. Os efeitos mecânicos ocasionados pelo uso do ultrassom podem aumentar a difusão interna e por detritos, intensificando a transferência de massa [88] e promovendo maior penetração de solvente na matriz da amostra [24]. O aumento de compostos fenólicos extraídos da casca de romã no UAPLE pode estar relacionado apenas à turbulência associada ao fluxo acústico, ou simplesmente associada a vibrações mecânicas.

**Tabela 8** - Rendimento de extração de compostos fenólicos de extratos da casca de romã usando diferentes potência de ultrassom e tamanho de partícula e cinco ciclos.

	Ciclo	Rendimento de extração (mg/g bs)				
		$\alpha$ -pun	$\beta$ -pun	EA-hex	EA	POCF*
0.68 mm 0 W	1	13.30 ± 1.09‡	30.09 ± 0.93‡	0.94 ± 0.02‡	1.27 ± 0.04‡	53.83 ± 1.66‡
	2	2.63 ± 0.26†‡	5.93 ± 0.82†	0.17 ± 0.02†‡	0.21 ± 0.03†	10.27 ± 1.22†‡
	3	0.45 ± 0.10†‡	0.92 ± 0.17†‡	0.00 ± 0.00‡	0.02 ± 0.01†‡	1.56 ± 0.31†‡
	4	0.15 ± 0.12†‡	0.25 ± 0.19†‡	0.00 ± 0.00‡	0.00 ± 0.00‡	0.45 ± 0.35†‡
	5	0.00 ± 0.00‡	0.00 ± 0.00‡	0.00 ± 0.00‡	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00‡
	<b>Soma</b>		<b>16.53 ± 1.56‡</b>	<b>37.20 ± 2.11†‡</b>	<b>1.10 ± 0.04‡</b>	<b>1.50 ± 0.08†‡</b>
0.68 mm 480 W	1	12.80 ± 1.07‡	29.65 ± 1.25‡	0.95 ± 0.04‡	1.21 ± 0.07‡	53.02 ± 1.56‡
	2	1.74 ± 0.29†‡	4.08 ± 0.60†‡	0.12 ± 0.03†‡	0.10 ± 0.01†‡	6.99 ± 1.12 †‡
	3	0.06 ± 0.02†‡	0.11 ± 0.05†‡	0.00 ± 0.00‡	0.00 ± 0.00†‡	0.17 ± 0.08†‡
	4	0.00 ± 0.00†	0.00 ± 0.00†	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00†
	5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	<b>Soma</b>		<b>14.60 ± 1.38</b>	<b>33.84 ± 1.90†</b>	<b>1.06 ± 0.07</b>	<b>1.31 ± 0.08†</b>
1.05 mm 0 W	1	6.34 ± 0.72†‡	14.41 ± 1.69†‡	0.46 ± 0.05†‡	0.61 ± 0.06†‡	26.15 ± 2.81†‡
	2	3.38 ± 0.34‡	7.30 ± 1.17	0.23 ± 0.03‡	0.26 ± 0.06	13.29 ± 1.82‡
	3	2.15 ± 0.45†‡	4.63 ± 0.93†‡	0.13 ± 0.03†‡	0.14 ± 0.05†‡	8.26 ± 1.62†‡
	4	1.50 ± 0.10†‡	3.19 ± 0.39†‡	0.08 ± 0.01†‡	0.07 ± 0.02†‡	5.64 ± 0.61†‡
	5	0.62 ± 0.26†‡	1.18 ± 0.43†‡	0.02 ± 0.02†‡	0.00 ± 0.00	2.12 ± 0.82‡
	<b>Soma</b>		<b>13.98 ± 1.87‡</b>	<b>30.71 ± 4.62‡</b>	<b>0.93 ± 0.14†‡</b>	<b>1.09 ± 0.18†‡</b>
1.05 mm 480 W	1	10.70 ± 1.06†‡	24.01 ± 2.77†‡	0.78 ± 0.06†‡	0.92 ± 0.15†‡	43.79 ± 4.24†‡
	2	3.49 ± 0.48‡	8.09 ± 1.34‡	0.25 ± 0.03‡	0.31 ± 0.07‡	14.28 ± 2.13‡
	3	0.89 ± 0.30†‡	2.18 ± 0.87†‡	0.05 ± 0.03†‡	0.06 ± 0.04†‡	3.66 ± 1.33†‡
	4	0.29 ± 0.26†	0.45 ± 0.38†	0.00 ± 0.00†	0.00 ± 0.00†	0.80 ± 0.70†
	5	0.00 ± 0.00†	0.00 ± 0.00†	0.00 ± 0.00†	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00†
	<b>Soma</b>		<b>15.37 ± 2.10</b>	<b>34.72 ± 5.35</b>	<b>1.08 ± 0.13†</b>	<b>1.35 ± 0.27†</b>

POCF: Soma de todos os compostos fenólicos extraídos da casca de romã; bs: amostra em base seca; †: indica diferença significativa entre as duas potências de ultrassom (0 e 480 W) em relação ao mesmo tamanho de partícula; ‡: indica diferença significativa entre os dois tamanhos de partícula (0.68 e 1.05 mm) em relação a mesma potência de ultrassom.

**Figura 12** - POCF acumulado (mg/g bs) comparando o efeito do ultrassom, o tamanho das partículas e o número de ciclos.



POCF: Soma de todos os compostos fenólicos extraídos da casca de romã; bs: amostra em base seca; Total: corresponde a quantidade total de compostos fenólicos extraída após os cinco ciclos em cada condição de extração estudada. As porcentagens descritas acima de cada barra mostram a relação entre as quantidades acumuladas de compostos fenólicos extraídas nos ciclos e o total extraído ao final dos cinco ciclos de extração.

Comparando a soma dos compostos fenólicos extraídos após cinco ciclos entre os tamanhos de partícula grande e pequena sem o uso de ultrassom, PCF e POCF foram estatisticamente diferentes. A soma foi maior em todos os casos com partículas pequenas. Em contraste, comparando a soma dos compostos fenólicos extraídos após cinco ciclos entre os tamanhos de partícula grande e pequena com o uso de ultrassom a 480 W, não houve diferença estatística. O uso de ultrassom pode ter compensado o efeito negativo do uso de partículas grandes no processo. Também é importante enfatizar que amostras pequenas causaram sérios problemas de entupimento, exigindo que a extração fosse interrompida e repetida várias vezes. Neste contexto, o uso de amostras com partículas grandes é aconselhável e, se possível, fazer uso do ultrassom, reduzindo o número de ciclos de extração necessários para atingir rendimentos semelhantes de cinco a três ciclos.

A maior eficiência do processo por ultrassom é atribuída à ruptura da célula que leva a uma maior acessibilidade do solvente para as estruturas internas das partículas. A **Figura 13** mostra as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da casca de romã (1.05 mm de diâmetro de partícula médio) apenas desidratada; após o processo de extração com PLE a 10 MPa e UAPLE a 10 MPa e poder de ultrassom de 480 W, com ampliação da imagem x500 (50  $\mu\text{m}$ ) e x1000 (10  $\mu\text{m}$ ).

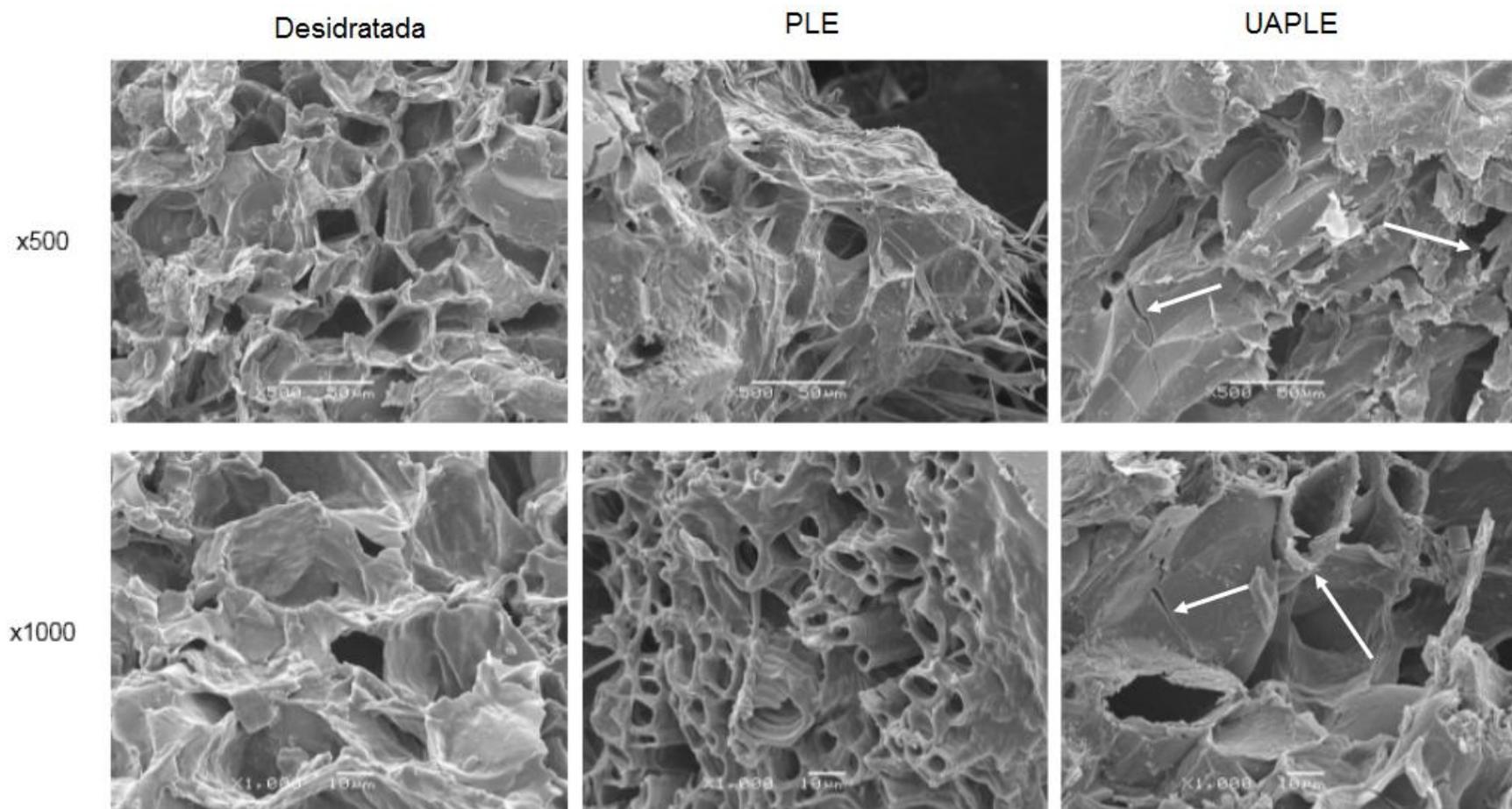
A correlação entre os mecanismos físicos de ultrassom e o aumento dos rendimentos de extração ainda é um desafio científico. Tem sido sugerido que o ultrassom afeta o processo de extração através de uma combinação de diferentes mecanismos, incluindo erosão, sonoporação, forças de cisalhamento, fragmentação, efeito capilar e detexturação, possivelmente de forma sequencial [27]. Estes efeitos podem ser observados dependendo dos parâmetros de extração e da natureza da matriz da planta.

Na **Figura 13**, é possível notar a detexturação da estrutura da matéria-prima após o tratamento com ultrassom, bem como evidências de forças de cisalhamento e erosão que afetam a matriz da matéria-prima, incluindo trincas e estruturas quebradas. Amostras submetidas ao ultrassom apresentam estruturas mais fragmentadas e com conformações irregulares, quando comparadas às matérias-primas em que o ultrassom não foi utilizado. Como pode ser visto, o ultrassom teve um efeito significativo na matriz da amostra, modificando suas características físicas. Por outro lado, o ultrassom aplicado em baixa pressão também

pode promover um intenso efeito de mistura associado à propagação de ondas ultrassônicas, o que pode acelerar a taxa de transferência de massa de analitos da matriz da amostra para o solvente. No entanto, uma vez que a amostra é embalada dentro de uma célula de extração e submetida a alta pressão, é improvável que uma mistura extensa esteja ocorrendo durante a UAPLE e, portanto, os efeitos físicos podem ser mais importantes do que a mistura.

Por fim, para acessar a repetibilidade do processo, cinco extrações com três ciclos sequenciais foram realizadas em três dias consecutivos. Os resultados indicaram uma excelente repetibilidade, com variação média menor que 1% para todos os compostos fenólicos presentes na amostra.

**Figura 13** - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da casca de romã.



#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que é possível combinar duas técnicas de extração (PLE e UAE) para melhorar a extração de compostos fenólicos de cascas de romã. Os resultados indicaram que vários fatores, como solvente, temperatura, potência de ultrassom, tamanho de partícula e número de ciclos e sua interação afetam o processo de extração. Independentemente da temperatura, a água foi o solvente de extração que proporcionou o maior QPC e POCF, e à medida que o percentual de etanol aumentou, os rendimentos de extração de compostos fenólicos diminuíram. As temperaturas mais adequadas para a extração de POCF utilizando água foram de 70 a 80 °C. Em geral, 100 °C não foi adequado para extração de PCF e POCF, uma vez que os menores rendimentos de extração foram observados. O tamanho das partículas foi um fator importante na determinação do grau de influência da aplicação do ultrassom para auxiliar no processo de extração.

A potência do ultrassom não teve efeito sobre a extração de PCF e POCF de partículas pequenas. Em contraste, o efeito foi evidente e positivo aplicando-se potências de 480 e 640 W em partículas grandes. É importante enfatizar que, embora os rendimentos de extração mais elevados tenham sido observados usando partículas pequenas, o entupimento das linhas do equipamento foi frequente e constantemente o processo de extração foi abortado e repetido.

A extração com ultrassom foi mais rápida (exigiu um ciclo a menos) para ambos os tamanhos de partículas. No entanto, POCF acumulado com partículas pequenas usando ultrassom foi menor do que sem ultrassom, e POCF acumulado com partículas grandes usando ultrassom foi o mesmo que sem ultrassom. O uso de ultrassom pode ter compensado o efeito negativo do uso de partículas grandes no processo. A maior eficiência do processo por ultrassom é atribuída à ruptura da célula que leva a uma maior acessibilidade do solvente para as estruturas internas das partículas. Utilizando amostras grandes, as melhores condições de extração foram obtidas com solvente de extração de água, temperatura de extração de 70 °C, potência ultrassônica de 480 W e 3 ciclos, obtendo-se  $61.72 \pm 7.70$  mg/g bs.

O UAPLE demonstrou ser uma alternativa limpa, eficiente e verde para a extração de compostos fenólicos de cascas de romã, pois permite a substituição de um solvente orgânico por água e reduz o tempo de extração utilizando uma temperatura relativamente baixa e evitando problemas de entupimento. Sem dúvida,

estes resultados sugerem um enorme potencial para separações de pequena escala, como quando usadas como técnicas de preparação de amostras para a análise de pequenas moléculas em produtos naturais ou em escala preparativa para a extração de vários miligramas de compostos alvo.

É possível considerar a UAPLE em escala industrial, mas os processos industriais de alta pressão podem ser desafiadores e os principais fatores envolvidos são a quantidade de produto a ser extraído e seu preço de venda. Para superar as limitações das sondas ultrassônicas de pequeno volume, é possível combinar vários sistemas semi-contínuos menores operando em sequência, permitindo uma saída contínua do produto e, portanto, reduzindo os custos envolvidos no processo. Essa estratégia pode ser útil especialmente no caso de processos que envolvam matérias-primas de baixo custo, como resíduos agroindustriais e pequenas quantidades de produtos de alto valor agregado, como compostos bioativos que podem ser usados como agentes terapêuticos. No entanto, cada processo deve ser estudado individualmente para determinar a potencial aplicação do UAPLE em escala industrial.

### **CAPITULO III**

**Avaliação do efeito biológico de extratos aquosos e etanólicos em células tumorais de monócitos humanos (THP-1)**

## CAPITULO III

### **Avaliação do efeito biológico de extratos aquosos e etanólicos em células tumorais de monócitos humanos (THP-1)**

#### **1. INTRODUÇÃO**

A romã é uma antiga planta nativa do Oriente Médio e alguns países asiáticos que foram utilizados na medicina herbal tradicional por muitas culturas [89]. Entre os anos de 2005 a 2015, 36 estudos mostraram que a romã, bem como seu suco, extrato e óleo exercem propriedades anti-inflamatórias, antiproliferativa e modulam múltiplas vias sinalização, sugerindo seu uso como um agente quimiopreventivo e quimioterápico promissor [90].

Além disso, o suco de romã já foi descrito para conter também proantocianidinas, antocianinas (glicósidos de delphinidina, peonidina e cianidina) e glicosídeos de flavonóides, que também apresentaram alguns efeitos antiproliferativos [66][91][92]. O suco de romã também foi mais potente que os compostos fenólicos isolados, sugerindo um efeito sinérgico ou aditivo dos outros fitoquímicos presentes no suco de romã [92], como observado neste estudo. Esses estudos reforçam coletivamente a hipótese de que todo o complexo de produtos de romã possui maior potencial de atividade antiproliferativa e proapoptótica contra células cancerosas do que seus principais compostos ativos.

A casca de romã é uma fonte natural que mostrou retardar a proliferação de células em várias linhas celulares de câncer humano sem causar toxicidade [93]. A característica de um agente terapêutico anticancerígeno promissor é a capacidade de qualquer composto quimioterápico inibir seletivamente a proliferação de células malignas, mas não normais [94]. As células tumorais geralmente perdem a capacidade de controlar a divisão celular, passando pelos pontos de controle do ciclo celular e resultando em um estado de proliferação descontrolada [95].

Muitos compostos utilizados para a quimioterapia são baseados na capacidade desses compostos para retardar a progressão do ciclo celular, através de uma prisão do ciclo celular, resultando em comprometimento da taxa de proliferação celular e, conseqüentemente, diminui o crescimento tumoral [96]. Os efeitos de citotoxicidade dos agentes quimioterapêuticos e a resistência ao fármaco em câncer

ainda são um desafio [60]. A este respeito, muitos estudos foram realizados para incluir compostos naturais em estratégias terapêuticas [97][98][99].

Devido à polaridade dos compostos fenólicos presentes na casca de romã, os solventes mais usados nas extrações são a água ou suas misturas hidroalcoólicas [100][101][102]. O solvente escolhido para a extração determinará o perfil químico final do extrato, de modo que as concentrações relativa e absoluta dos compostos derivados também afetarão significativamente sua bioatividade [1]. Para o ácido elágico, o uso de um solvente moderadamente polar, como o metanol ou o etanol, deve aumentar a eficiência de extração e sua concentração no extrato final. No entanto, o uso de um solvente altamente polar, como a água, deve reduzir a eficiência de extração do ácido elágico e conseqüentemente sua concentração final. Essas tendências também se mantêm para outros componentes das cascas de romã que são mais solúveis ou menos solúveis dependendo do solvente de extração.

Em relação à ação do extrato da casca de romã em células THP-1, a punicalagina foi identificada como componente ativo que pode atenuar em nível celular a inflamação induzida por partículas em suspensão presentes no ar poluído, ou seja, os efeitos protetores da punicalagina diminuíram o estresse oxidativo e as respostas inflamatórias induzidas pela poeira nociva no ar. Não só a punicalagina oferece efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios por conta própria, mas seus metabólitos podem fornecer efeitos similares no corpo [55]. Considerando a importância do solvente de extração na composição do extrato e potencialmente sua influência na atividade biológica, o objetivo deste trabalho foi acessar a bioatividade de diferentes extratos de cascas de romã contra células leucêmicas de THP-1 e determinar sua relação com a perfil químico.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

Meio de cultura RPMI-1640, L-Glutamina (200 mM), Penicilina/Estreptomicina (10.000 U/mL and 10.000 µg/mL, respectivamente), Soro Fetal Bovino (SFB) e iodeto de propídeo (1 mg/mL) foram adquiridos da Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, CA, EUA). Triton X-100, NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> foram adquiridos da Amresco (Solon, OH, EUA). RNase foi adquirida da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A linhagem celular de monócitos humanos (THP-1), derivada de um paciente com leucemia monocítica aguda, foi adquirida no laboratório do Prof. Dr. Rui Curi (ICB-USP).

### **2.1. Cultura de células**

As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C .

### **2.2. Tratamento das células**

As células THP-1 foram semeadas a uma densidade de 3x10<sup>5</sup> células por poço em placas de 24 poços e crescidas durante 24 horas em meio de cultura regular. As células foram tratadas com um volume fixo de 18 µL de cada extrato Água [A], EtOH 30% [B], EtOH 50% [C] e EtOH 70% [D], adicionado em 1 mL de meio de cultura regular durante 48 horas. Cada amostra foi diluída nos solventes específicos utilizando, por exemplo [extrato A]: 9 µL de A + 9 µL de água, para ajustar o volume de tratamento em 18 µL. O volume fixo de 18 µL foi definido para evitar que a concentração final de etanol no poço ultrapassasse 1.25%. Após o período de tratamento, foram coletados 400 µL de suspensão celular e o perfil do ciclo celular foi analisado por citometria de fluxo.

### **2.3. Análise do DNA fragmentado e ciclo celular por citometria**

A distribuição do ciclo celular e a porcentagem de DNA fragmentado foram avaliadas medindo o conteúdo de DNA por citometria de fluxo, seguindo o protocolo de marcação com iodeto de propídio. Após o período de tratamento, as células foram colhidas e lavadas com solução salina tamponada de fosfato. As células foram fixadas com etanol frio (70%) no banho de gelo durante 30 minutos e depois coradas com 20 µg/mL de iodeto de propídio diluído em SFB contendo 10 µg/mL de RNase A e 0.1% de Triton X-100 à temperatura ambiente por 30 minutos no escuro. Em seguida, as células coradas foram analisadas no citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), utilizou-se FL-2A para avaliar o conteúdo de DNA das células e 10.000 eventos foram registrados por amostra. Cada experimento foi realizado em triplicata, e três repetições biológicas independentes foram analisadas para realizar as análises estatísticas.

## 2.4. Extrações por UAPLE

As extrações UAPLE de compostos fenólicos presentes na casca de romã foram realizadas no sistema de extração EXTRACT-US de acordo com o descrito na seção **2.2 do Capítulo II** deste projeto. Foi utilizado um grama de matéria-prima, potência de ultrassom a 400 W, frequência a 19 kHz, fluxo a 3 mL/min, pressão em 100 bar, temperatura a 70 °C e solventes de extração A, B, C e D.

## 2.5. Análise estatística

Foram realizados três experimentos independentes com células de diferentes lotes. Todos os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferentes tratamentos foram comparados por One-Way ANOVA seguido de teste post-hoc Tukey. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SigmaStat versão 3.5 para Windows (Systat Software, Inc., Point Richmond, CA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando as probabilidades eram menores que 0.05 ( $p < 0.05$ ).

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1. O perfil dos compostos fenólicos extraídos foi significativamente influenciado pelo uso de diferentes solventes

De acordo com a **Tabela 9**, notou-se que alguns compostos não estavam presentes em todos os extratos e diferenças significativas foram observadas na concentração daqueles que estavam presentes. Os picos não detectados foram: 7, 10, 15, 16 e 20 (extrato A); 4, 5, 6, 15, 16 e 20 (extrato B); 3, 5, 7 e 12 (extrato C); 1, 2, 3, 5, 6, 7, 10, 12, 15 e 16 (extrato D). A principal diferença entre os extratos foi a concentração relativa dos compostos extraídos. As concentrações mais altas de  $\alpha$ -pun e  $\beta$ -pun foram observadas no extrato A. As concentrações mais altas de AE-hex e AE foram observadas nos extratos B e C.

Ao considerar apenas a somatória total da concentração de  $\alpha$ -pun,  $\beta$ -pun, AE-hex e AE (Principais Compostos Fenólicos, PCF), a água foi o solvente que proporcionou o maior rendimento de extração ( $1920.02 \pm 69.76$  mg/L). Em contraste, ao considerar todos os compostos fenólicos detectados, etanol 30% foi capaz de extrair a maior quantidade de compostos fenólicos, POCF, ( $2581.50 \pm 129.67$  mg/L) como mostrado na **Tabela 9**. Quanto maior a polaridade do solvente de extração,

maior a concentração de punicalagina e derivados nos extratos. As maiores concentrações de AE foram observadas nos extratos B e C ( $93.01 \pm 0.61$  e  $91.10 \pm 0.20$  mg/L, respectivamente), e menor no extrato aquoso ( $66.38 \pm 0.21$  mg/L).

### **3.2. Diferentes tratamentos com extratos de romã alteram a progressão do ciclo celular de células THP-1**

As células THP-1 foram tratadas com os extratos obtidos durante 48 horas e a distribuição do ciclo celular foi avaliada após a coloração com iodeto de propídio (PI). Posteriormente, as células foram analisadas por citometria de fluxo usando o protocolo para rotular o DNA com iodeto de propídio e foram avaliados os efeitos biológicos na progressão do ciclo celular das células leucêmicas. A escolha do solvente de extração é crítica e determina o perfil químico do extrato, como as concentrações absolutas e relativas dos compostos extraídos. Nossos resultados sugerem que, na gama de solventes testados (água e misturas com etanol), que são bastante polares, a principal diferença no extrato está relacionada à concentração dos principais compostos extraídos.

Foi observado que os extratos da casca de romã induziram o encerramento do ciclo celular. Este resultado pode ser relacionado com a quantidade de PCF em cada extrato. As punicalaginas estão presentes em maior concentração no extrato produzido com o solvente A do que o extrato produzido com o solvente D. Para verificar se esta diferença da concentração de punicalagina resultaria em diferenças no ciclo celular, foram comparados os efeitos do tratamento usando ambos os extratos.

Ao considerar o uso de extratos produzidos com diferentes solventes para o tratamento de células, o solvente geralmente desempenha um papel significativo no ciclo celular, podendo ser tóxico para a célula. Idealmente, portanto, ao avaliar as propriedades funcionais dos extratos vegetais, o mesmo solvente deve ser usado como controle. Por conseguinte, as células THP-1 de monócitos leucêmicos foram tratadas utilizando o mesmo volume de todos os extratos e o volume de tratamento foi definido com base na concentração de etanol no poço da placa, que não poderia exceder 1.25%. Os testes de toxicidade do etanol em células THP-1 mostraram que esta concentração de 1.25% não causou alterações na progressão do ciclo celular, mesmo na porcentagem de DNA fragmentados. Este achado indica que o extrato

aquoso nos permite usar uma maior quantidade de extrato no tratamento de células, sem causar qualquer toxicidade influenciada pelo solvente.

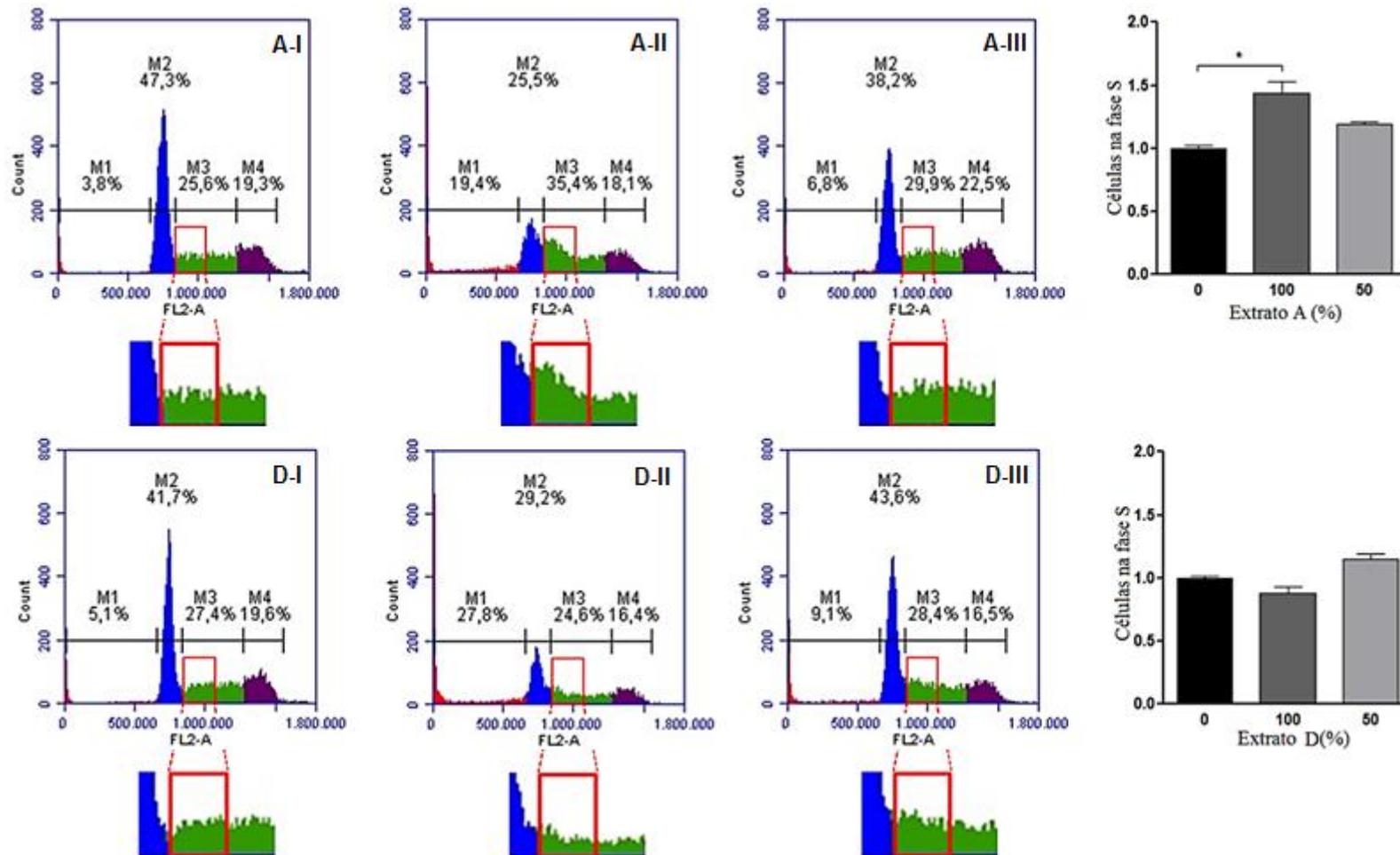
**Tabela 9** - Concentração (mg/L) dos compostos detectados por HPLC em extratos obtidos a partir da casca de romã usando diferentes solventes.

Composto	Concentração (mg/L)			
	Água	EtOH 30%	EtOH 50%	EtOH 70%
$\alpha$ -pun	562.26 $\pm$ 47.14 <sup>A</sup>	477.37 $\pm$ 26.41 <sup>B</sup>	318.67 $\pm$ 31.90 <sup>C</sup>	259.09 $\pm$ 19.71 <sup>C</sup>
$\beta$ -pun	1251.13 $\pm$ 22.21 <sup>A</sup>	1112.63 $\pm$ 54.89 <sup>B</sup>	634.87 $\pm$ 37.36 <sup>C</sup>	506.55 $\pm$ 4.68 <sup>D</sup>
AE-hex	40.25 $\pm$ 0.20 <sup>B</sup>	49.68 $\pm$ 0.18 <sup>A</sup>	48.49 $\pm$ 0.36 <sup>A</sup>	36.25 $\pm$ 1.57 <sup>C</sup>
AE	66.38 $\pm$ 0.21 <sup>C</sup>	93.01 $\pm$ 0.61 <sup>A</sup>	91.10 $\pm$ 0.20 <sup>AB</sup>	88.87 $\pm$ 2.90 <sup>B</sup>
PCF	1920.02 $\pm$ 69.76 <sup>A</sup>	1732.69 $\pm$ 82.09 <sup>B</sup>	1093.13 $\pm$ 69.82 <sup>C</sup>	890.76 $\pm$ 28.86 <sup>D</sup>
POCF	2283.94 $\pm$ 80.43 <sup>B</sup>	2581.50 $\pm$ 129.67 <sup>A</sup>	1571.78 $\pm$ 101.87 <sup>C</sup>	1095.13 $\pm$ 42.54 <sup>D</sup>

\*PCF: soma dos quatro compostos principais ( $\alpha$ -pun,  $\beta$ -pun, AE-hex e AE); POCF: Soma de todos os compostos fenólicos extraídos da casca de romã; MPOCF: Média de POCF de todas as temperaturas no mesmo solvente; Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP); Resultados com letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as concentrações dos compostos estudados, a 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey.

A **Figura 14** apresenta o ciclo celular das células após 48 horas de tratamento A-I (18  $\mu$ L de água); tratamento A-II (18  $\mu$ L de extrato A); tratamento A-III (9  $\mu$ L de extrato A + 9  $\mu$ L de água); D-I (18  $\mu$ L de etanol 70%); tratamento D-II (18  $\mu$ L de extrato D); tratamento D-III (9  $\mu$ L de extrato D + 9  $\mu$ L de etanol 70%). Os dados são representativos de três experiências independentes.

**Figura 14** - Ciclo celular após tratamento com extratos A e D.



Resultados marcados com o asterisco indicam que há diferença significativa entre as proporções de células na fase S, a 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey. M1: representa a quantidade de células com o DNA fragmentado; M2: representa a quantidade de células na fase G1; M3: representa a quantidade de células na fase S; M4: representa a quantidade de células na fase G2.

Verificou-se que a porcentagem de células presentes na fase S do ciclo celular (que controla a duplicação do DNA), variou conforme os tratamentos. O tratamento A-II teve um aumento significativo na porcentagem de células na fase S quando comparado ao tratamento A-I, de 38.28%. Este efeito corrobora estudos sobre o tratamento de células leucêmicas com suco de romã [57][58]. Além disso, outros estudos observaram aumento da porcentagem de células em outras fases do ciclo celular, como em G2/M, ao usar extrato da casca de romã obtido por outro método de extração e usando uma linha celular diferente (K562) [56]. A fase S é um dos alvos de vários fármacos anticancerosos para reduzir a proliferação de células tumorais, como metotrexato, pralatrexato, 7-hidroxiataurosporina (UCN-01), etoposido e muitos outros [103][104][105]. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na fase S entre os tratamentos A-I e A-III.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na porcentagem de células na fase S entre os tratamentos D-I, D-II e D-III, o que pode estar relacionado com a baixa quantidade de compostos fenólicos totais presentes no extrato ( $1095.13 \pm 42.54$  mg/L) e também pela baixa quantidade de punicalaginas alfa e beta ( $259.09 \pm 19.71$  e  $506.55 \pm 4.68$  mg/L, respectivamente), pois as punicalaginas são os compostos fenólicos da romã mais responsáveis por alterar o ciclo celular [58].

### **3.3. Os tratamentos com extratos de romã aumento a porcentagem de células THP-1 com DNA fragmentado**

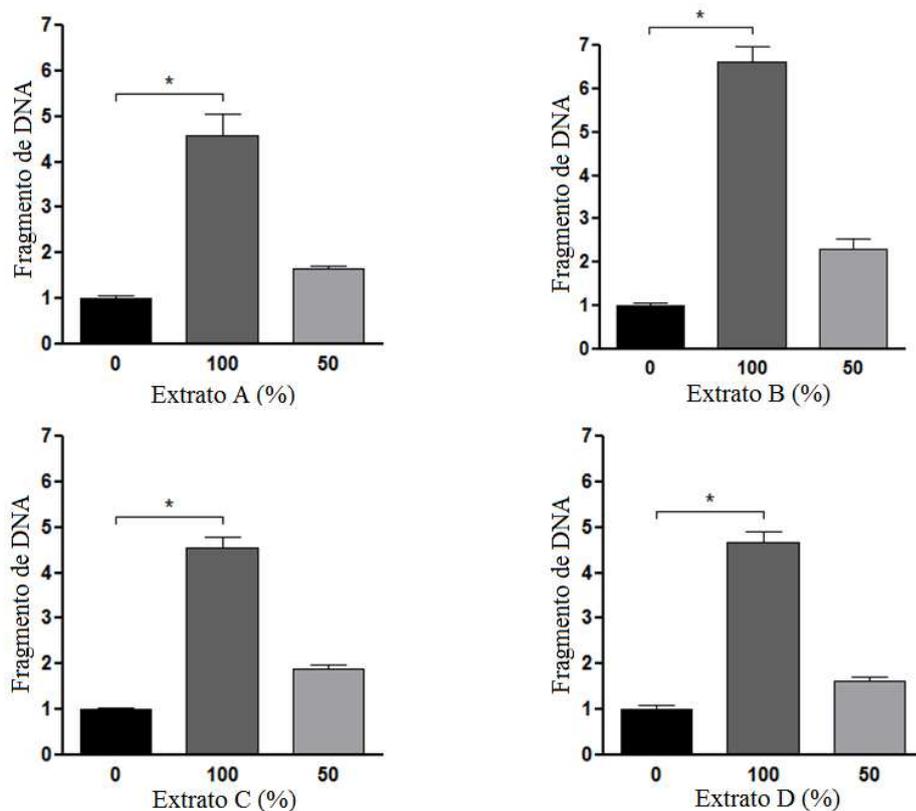
Observou-se o aumento significativo de células com DNA fragmentado quando as células foram tratadas com todos os extratos durante 48 horas. Em todos os quadrantes da **Figura 15**, a primeira barra representa as células tratadas com a 18  $\mu$ L do solventes de extração específico (amostra controle); a segunda barra representa as células tratadas com 18  $\mu$ L do extrato específico (A, B, C ou D); e a terceira barra representa as células tratadas com 9  $\mu$ L do extrato específico (A, B, C ou D) e mais 9  $\mu$ L do solventes de extração específico.

O maior aumento foi observado quando o extrato B (30% de etanol) foi utilizado. O tratamento com o extrato B aumentou cerca de 6.5 vezes a porcentagem de células com DNA fragmentado, em comparação com amostras de controle. Nos demais tratamentos, o aumento foi de quase 5 vezes. Esse resultado pode estar relacionado com a maior quantidade de POCF presentes nos extratos, sendo que no

extrato B observou-se a maior quantidade deles ( $2581.50 \pm 9.95$  mg/L). Os resultados também sugerem que a porcentagem de compostos fragmentados esteja relacionada com outros compostos fenólicos presentes na casca de romã, que não foram identificados ou quantificados nesse projeto.

O aumento de células com DNA fragmentado indica indução de apoptose (morte celular de resposta precoce), sendo um marcador útil para prever a resposta tumoral ao tratamento anticancerígeno [106]. Um estudo realizado com duas linhas celulares de linfoma de Burkitt humano, Raji e P3HR-1, mostrou que o extrato aquoso da casca de romã resultou na fragmentação apoptótica do DNA e na supressão do crescimento [93]. Assim, nossos dados revelaram que o aumento da porcentagem de células com DNA fragmentado pode estar relacionado à concentração de compostos fenólicos totais presentes nos extratos da casca de romã e também a outros compostos.

**Figura 15** - Porcentagem de DNA fragmentado após tratamento com os extratos



Resultados marcados com o asterisco indicam que há diferença significativa entre as proporções de fragmentos de DNA, a 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey.

#### 4. CONCLUSÕES

A quantidade e a composição dos compostos fenólicos obtidos foram significativamente influenciadas pelo uso de diferentes solventes, bem como a resposta biológica. Os resultados sugerem que a presença dos quatro compostos fenólicos predominantes ( $\alpha$ -pun,  $\beta$ -pun, AE-hex e AE), induzem os efeitos de parada do ciclo celular. As punicalaginas estavam presentes principalmente no extrato aquoso e podem ser as principais responsáveis pelo acúmulo de células na fase S. O aumento na porcentagem de células com DNA fragmentado foi relacionado à concentração de POCF presentes no extrato da casca de romã. Embora este trabalho tenha sido realizado usando cultura celular, experiências *in vitro* podem ser uma valiosa ferramenta de triagem para estudos futuros em animais e humanos, avaliando o uso da casca de romã no tratamento e/ou prevenção de leucemias.

## CONCLUSÕES GERAIS

No Capítulo I, todas as variáveis em estudo (temperatura, frequência de ultrassom e modo de operação) tiveram efeito significativo na extração de compostos fenólicos ( $\alpha$ -pun,  $\beta$ -pun e AE) da casca de romã, bem como sobre FT e  $X_0$  no processo de extração UAE. Temperaturas em torno de 50 e 70 °C, frequência de 37 kHz e modos de operação normal e pulsos, foram as condições que forneceram os melhores rendimentos de compostos fenólicos. Altos valores nos rendimentos dos compostos fenólicos, fenólicos totais e rendimento global de extrato foram obtidos em muitas condições estudadas, por exemplo a 60 °C, 37 kHz e modo contínuo, foram obtidos  $43.20 \pm 0.50$  mg de compostos fenólicos/g de amostra seca (bs),  $154.34 \pm 16.21$  mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/g bs de FT (fenólicos totais) e rendimento global de extrato de 59%. Para a extração de compostos fenólicos da casca de romã em UAE, sugere-se o uso de frequência de 37 kHz ao invés de 80 kHz, pois a força de implosão e cisalhamento das bolhas no processo de extração podem ser maiores, resultando em temperaturas e pressões mais altas na zona de cavitação. Na maioria dos casos estudados os resultados obtidos com o uso do modo de operação sweep não foi adequado (ao invés do uso dos modos pulsos e contínuo), possivelmente devido ao efeito negativo da cavitação e da dinâmica da bolha. Os resultados indicaram que a extração a baixa pressão e com ultrassom (UAE) utilizando solvente etanol 70% (v:v) é uma técnica adequada e segura para a recuperação de compostos fenólicos da casca de romã.

No Capítulo II, observou-se que é possível combinar duas técnicas de extração (PLE e UAE) e que os fatores: solvente, temperatura, potência de ultrassom, tamanho de partícula, número de ciclos e interação entre tais fatores afetam o processo de extração no processo de extração UAPLE. O solvente de extração água e temperaturas de 70 a 80 °C proporcionaram maior POCF. A potência do ultrassom não teve efeito sobre a extração de PCF e POCF usando partículas pequenas. Em contraste, o efeito foi evidente e positivo ao aplicar potências de 480 e 640 W em partículas grandes. Utilizando partículas grandes, as melhores condições de extração foram obtidas com solvente de extração água, temperatura de extração a 70 °C, potência ultrassônica de 480 W e 3 ciclos, obtendo-se  $61.72 \pm 7.70$  mg/g bs. UAPLE demonstrou ser uma alternativa limpa, eficiente e verde para a extração de compostos fenólicos de cascas de romã, pois permite a substituição de solventes orgânicos por

água e reduz o tempo de extração utilizando temperaturas relativamente baixas e evitando problemas de entupimento.

No Capítulo III, ao considerar a somatória total da concentração de  $\alpha$ -pun,  $\beta$ -pun, AE-hex e AE, a água foi o solvente que proporcionou o maior rendimento de extração ( $1920.02 \pm 69.76$  mg/L). Em contraste, ao considerar todos os compostos fenólicos detectados, etanol 30% foi capaz de extrair a maior quantidade de compostos fenólicos, POCF, ( $2581.50 \pm 129.67$  mg/L). Foi observado que os extratos da casca de romã induziram o encerramento do ciclo celular. Este resultado pode ser relacionado com as concentrações de PCF e POCF de cada extrato. Observou-se o aumento significativo de células com DNA fragmentado em 48 horas, comparado com 24 horas. O tratamento com o extrato produzido com o solvente etanol 30% aumentou cerca de 6.5 vezes a porcentagem de células com DNA fragmentado, em comparação com amostras controle. O aumento da porcentagem de células com DNA fragmentado pode estar relacionado à concentração de compostos fenólicos totais presentes nos extratos da casca de romã e também a outros compostos.

## REFERÊNCIAS

- [1] ROSTAGNO, Mauricio A.; PRADO, Juliana M. (Ed.). **Natural Product Extraction: Principles and Applications**. Royal Society of Chemistry, 2013.
- [2] EL-NEMR, S. E.; ISMAIL, I. A.; RAGAB, M. Chemical composition of juice and seeds of pomegranate fruit. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 34, n. 7, p. 601-606, 1990.
- [3] SALGADO, Jocelem Mastrodi et al. Increased antioxidant content in juice enriched with dried extract of pomegranate (*Punica granatum*) peel. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 67, n. 1, p. 39-43, 2012.
- [4] FISCHER, Ulrike A.; CARLE, Reinhold; KAMMERER, Dietmar R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSn. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 807-821, 2011.
- [5] SOHRAB, Golbon et al. Effects of pomegranate juice consumption on inflammatory markers in patients with type 2 diabetes: A randomized, placebo-controlled trial. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 19, n. 3, p. 215, 2014.
- [6] ORGIL, Ola et al. The antioxidative and anti-proliferative potential of non-edible organs of the pomegranate fruit and tree. **LWT-Food Science and Technology**, v. 58, n. 2, p. 571-577, 2014.
- [7] BANIHANI, Saleem; SWEDAN, Samer; ALGURAAN, Ziyad. Pomegranate and type 2 diabetes. **Nutrition Research**, v. 33, n. 5, p. 341-348, 2013.
- [8] AL-JARALLAH, Aishah et al. The effect of pomegranate extract on coronary artery atherosclerosis in SR-BI/APOE double knockout mice. **Atherosclerosis**, v. 228, n. 1, p. 80-89, 2013.
- [9] HAMOUD, Shadi et al. Pomegranate extract (POMx) decreases the atherogenicity of serum and of human monocyte-derived macrophages (HMDM) in simvastatin-treated hypercholesterolemic patients: a double-blinded, placebo-controlled, randomized, prospective pilot study. **Atherosclerosis**, v. 232, n. 1, p. 204-210, 2014.

- [10] MUSTAFA, Arwa; TURNER, Charlotta. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 703, n. 1, p. 8-18, 2011.
- [11] ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans. **Analytica Chimica Acta**, v. 522, n. 2, p. 169-177, 2004.
- [12] WIJNGAARD, Hilde et al. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 505-513, 2012.
- [13] DEL PILAR GARCIA-MENDOZA, Maria et al. Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juçara (*Euterpe edulis* Mart.) residues using pressurized liquids and supercritical fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 119, p. 9-16, 2017.
- [14] PAES, Juliana et al. Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO<sub>2</sub> and pressurized liquids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 95, p. 8-16, 2014.
- [15] SETYANINGSIH, W. et al. Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from rice (*Oryza sativa*) grains. **Food Chemistry**, v. 192, p. 452-459, 2016.
- [16] SHANG, Ya Fang; KIM, Sang Min; UM, Byung-Hun. Optimisation of pressurised liquid extraction of antioxidants from black bamboo leaves. **Food Chemistry**, v. 154, p. 164-170, 2014.
- [17] SINGH, Pushp Pal; SALDAÑA, Marleny DA. Subcritical water extraction of phenolic compounds from potato peel. **Food Research International**, v. 44, n. 8, p. 2452-2458, 2011.
- [18] ÇAM, Mustafa; HIŞİL, Yaşar. Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p. 878-885, 2010.
- [19] ALEXANDRE, Elisabete MC et al. Experimental design, modeling, and optimization of high-pressure-assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate peel. **Food and Bioprocess Technology**, v. 10, n. 5, p. 886-900, 2017.

- [20] MACHADO, Ana Paula Da Fonseca et al. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. **Food Research International**, v. 77, p. 675-683, 2015.
- [21] SANTOS, Diego T.; VEGGI, Priscilla C.; MEIRELES, M. Angela A. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 3, p. 444-452, 2012.
- [22] REÁTEGUI, José Luis Pasquel et al. Extraction of antioxidant compounds from blackberry (*Rubus* sp.) bagasse using supercritical CO<sub>2</sub> assisted by ultrasound. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 94, p. 223-233, 2014.
- [23] KAZEMI, Milad et al. Optimization of pulsed ultrasound-assisted technique for extraction of phenolics from pomegranate peel of Malas variety: Punicalagin and hydroxybenzoic acids. **Food Chemistry**, v. 206, p. 156-166, 2016.
- [24] ROSTAGNO, Mauricio A.; PALMA, Miguel; BARROSO, Carmelo G. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. **Journal of Chromatography A**, v. 1012, n. 2, p. 119-128, 2003.
- [25] TABARAKI, Reza; HEIDARIZADI, Elham; BENVIDI, Ali. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 98, p. 16-23, 2012.
- [26] ESPADA-BELLIDO, Estrella et al. Optimization of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp. **Food Chemistry**, v. 219, p. 23-32, 2017.
- [27] CHEMAT, Farid et al. Review of green food processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 41, p. 357-377, 2017.
- [28] ROSTAGNO, M. A.; D'ARRIGO, M.; MARTÍNEZ, J. A. Combinatory and hyphenated sample preparation for the determination of bioactive compounds in foods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 6, p. 553-561, 2010.

- [29] SANTOS, Philipe et al. Supercritical carbon dioxide extraction of capsaicinoids from malagueta pepper (*Capsicum frutescens* L.) assisted by ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 78-88, 2015.
- [30] SORIA, Ana Cristina; VILLAMIEL, Mar. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 7, p. 323-331, 2010.
- [31] ROSTAGNO, M. A.; Nuevos métodos para la determinación de isoflavonas en soja y alimentos derivados, 2005.
- [32] KRUGER, C. L.; MANN, S. W. Safety evaluation of functional ingredients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 6, p. 793-805, 2003.
- [33] GIL, Maria I. et al. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 48, n. 10, p. 4581-4589, 2000.
- [34] SEERAM, Navindra P.; LEE, Rupo; HEBER, David. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. **Clinica Chimica Acta**, v. 348, n. 1-2, p. 63-68, 2004.
- [35] LARROSA, Mar; TOMÁS-BARBERÁN, Francisco A.; ESPÍN, Juan Carlos. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, n. 9, p. 611-625, 2006.
- [36] CERDÁ, Begoña et al. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. **European Journal of Nutrition**, v. 42, n. 1, p. 18-28, 2003.
- [37] MERTENS-TALCOTT, Susanne U. et al. Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 23, p. 8956-8961, 2006.

- [38] ROSAS, Monica SL et al. Incidência do câncer no Brasil e o potencial uso dos derivados de isatinas na cancerologia experimental. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 2, p. 243-265, 2013.
- [39] JOSEPH, Manu M. et al. A galactomannan polysaccharide from *Punica granatum* imparts in vitro and in vivo anticancer activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1466-1475, 2013.
- [40] COSTANTINI, Susan et al. Potential anti-inflammatory effects of the hydrophilic fraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil on breast cancer cell lines. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 8644-8660, 2014.
- [41] USHA, Talambedu et al. Identification of anti-cancer targets of eco-friendly waste *Punica granatum* peel by dual reverse virtual screening and binding analysis. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, p. 10345-50, 2014.
- [42] EL-AWADY, Mohamed A.; AWAD, Nabil S.; EL-TARRAS, Adel E. Evaluation of the anticancer activities of pomegranate (*Punica granatum*) and harmal (*Rhazya stricta*) plants grown in Saudi Arabia. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 4, n. 5, p. 1158-1167, 2015.
- [43] ZHOU, Benhong et al. Anti-Proliferative Effects of Polyphenols from Pomegranate Rind (*Punica granatum* L.) on EJ Bladder Cancer Cells Via Regulation of p53/miR-34a Axis. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 3, p. 415-422, 2015.
- [44] LI, Yali et al. *Punica granatum* (pomegranate) leaves extract induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and inhibits migration and invasion in non-small cell lung cancer in vitro. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 80, p. 227-235, 2016.
- [45] FRESCO, P. et al. The anticancer properties of dietary polyphenols and its relation with apoptosis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 1, p. 114-134, 2010.
- [46] DAI, Jin; MUMPER, Russell J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, 2010.

- [47] ALMEIDA, VL de et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- [48] VANCE, Keith W. et al. Tbx2 is overexpressed and plays an important role in maintaining proliferation and suppression of senescence in melanomas. **Cancer Research**, v. 65, n. 6, p. 2260-2268, 2005.
- [49] MALUMBRES, Marcos; BARBACID, Mariano. Cell cycle kinases in cancer. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 17, n. 1, p. 60-65, 2007.
- [50] FOSTER, Irene. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, n. 2, p. 144-149, 2008.
- [51] FISCHER, Peter M.; GLOVER, David M.; LANE, David P. Targeting the cell cycle. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 1, n. 4, p. 417-423, 2004.
- [52] HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- [53] LANSKY, Ephraim P.; NEWMAN, Robert A. Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 2, p. 177-206, 2007.
- [54] NAIR, Vidhya et al. Pomegranate extract induces cell cycle arrest and alters cellular phenotype of human pancreatic cancer cells. **Anticancer Research**, v. 31, n. 9, p. 2699-2704, 2011.
- [55] PANTH, Nisha; MANANDHAR, Bikash; PAUDEL, Keshav Raj. Anticancer activity of punica granatum (pomegranate): a review. **Phytotherapy Research**, 2017.
- [56] ASMAA, Mat Jusoh Siti et al. Growth inhibitory effects of crude pomegranate peel extract on chronic myeloid leukemia, K562 cells. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, v. 5, n. 2, p. 100, 2015.
- [57] DAHLAWI, Haytham et al. Bioactive actions of pomegranate fruit extracts on leukemia cell lines in vitro hold promise for new therapeutic agents for leukemia. **Nutrition and Cancer**, v. 64, n. 1, p. 100-110, 2012.

- [58] DAHLAWI, Haytham et al. Polyphenols are responsible for the proapoptotic properties of pomegranate juice on leukemia cell lines. **Food science & Nutrition**, v. 1, n. 2, p. 196-208, 2013.
- [59] AKSENTIJEVICH, Ivan; FLINN, Ian. Chemotherapy and bone marrow reserve: lessons learned from autologous stem cell transplantation. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 17, n. 4, p. 399-403, 2002.
- [60] HOUSMAN, Genevieve et al. Drug resistance in cancer: an overview. **Cancers**, v. 6, n. 3, p. 1769-1792, 2014.
- [61] HUANG, Y. D.; LU, Q. Y. Research Progress on the Drug Resistance Mechanism of Acute Myeloid Leukemia Mediated by the MicroRNA-Review. **Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi**, v. 25, n. 1, p. 255-258, 2017.
- [62] PIACENTE, S. et al. Metabolomics of Healthy Berry Fruits. **Current Medicinal Chemistry**, 2016.
- [63] EL-MEGHAWRY, E. L. et al. Natural products against cancer angiogenesis. **Tumor Biology**, v. 37, n. 11, p. 14513-14536, 2016.
- [64] WALCZAK, Katarzyna; MARCINIAK, Sebastian; RAJTAR, Grazyna. Cancer chemoprevention-selected molecular mechanisms. **Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej**, v. 71, p. 149-161, 2017.
- [65] YATES, Allison A. et al. Bioactive nutrients-time for tolerable upper intake levels to address safety. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 84, p. 94-101, 2017.
- [66] AKHTAR, Saeed et al. Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. **Food Chemistry**, v. 174, p. 417-425, 2015.
- [67] SONG, Bingbing; LI, Jia; LI, Jianke. Pomegranate peel extract polyphenols induced apoptosis in human hepatoma cells by mitochondrial pathway. **Food and Chemical Toxicology**, v. 93, p. 158-166, 2016.
- [68] WATERHOUSE, Andrew L. Determination of total phenolics. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, 2002.

- [69] CHEMAT, Farid et al. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813-835, 2011.
- [70] QU, Wenjuan; PAN, Zhongli; MA, Haile. Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. **Journal of Food Engineering**, v. 99, n. 1, p. 16-23, 2010.
- [71] SOOD, Ankita; GUPTA, Mahesh. Extraction process optimization for bioactive compounds in pomegranate peel. **Food Bioscience**, v. 12, p. 100-106, 2015.
- [72] TIWARI, Brijesh K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 100-109, 2015.
- [73] PATIST, Alex; BATES, Darren. Ultrasonic innovations in the food industry: from the laboratory to commercial production. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 147-154, 2008.
- [74] CHUKWUMAH, Yvonne C. et al. Effect of frequency and duration of ultrasonication on the extraction efficiency of selected isoflavones and trans-resveratrol from peanuts (*Arachis hypogaea*). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 16, n. 2, p. 293-299, 2009.
- [75] GOGATE, Parag R.; KABADI, Abhijeet M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 60-72, 2009.
- [76] SERVANT, G. et al. On the interaction between ultrasound waves and bubble clouds in mono-and dual-frequency sonoreactors. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 10, n. 6, p. 347-355, 2003.
- [77] FENG, Ruo et al. Enhancement of ultrasonic cavitation yield by multi-frequency sonication. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 9, n. 5, p. 231-236, 2002.
- [78] HASHEMI, Seyed Mohammad Bagher et al. Kolkhoung (*Pistacia khinjuk*) kernel oil quality is affected by different parameters in pulsed ultrasound-assisted solvent extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 28-33, 2015.

- [79] YOU, Qinghong; YIN, Xiulian; JI, Chaowen. Pulsed counter-current ultrasound-assisted extraction and characterization of polysaccharides from *Boletus edulis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 379-385, 2014.
- [80] HAHN, Russell H. Standards, engineering practices and data adopted by the American Society of Agricultural Engineers. **American Society of Agricultural Engineers**. St. Joseph, Mich.
- [81] KODA, Shinobu et al. A standard method to calibrate sonochemical efficiency of an individual reaction system. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 10, n. 3, p. 149-156, 2003.
- [82] JURENKA, Julie et al. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum L.*): a review. **Alternative Medicine Review**, v. 13, n. 2, p. 128, 2008.
- [83] HUIE, Carmen W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 373, n. 1-2, p. 23-30, 2002.
- [84] JACOTET-NAVARRO, M. et al. Towards a “dry” bio-refinery without solvents or added water using microwaves and ultrasound for total valorization of fruit and vegetable by-products. **Green Chemistry**, v. 18, n. 10, p. 3106-3115, 2016.
- [85] INCE, Nilsun H. Ultrasound-assisted advanced oxidation processes for water decontamination. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 40, p. 97-103, 2018.
- [86] ASCACIO-VALDÉS, Juan A. et al. The complete biodegradation pathway of ellagitannins by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. **Journal of Basic Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 329-336, 2016.
- [87] PAPADOPOULOU, Athina; FRAZIER, Richard A. Characterization of protein–polyphenol interactions. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 3-4, p. 186-190, 2004.
- [88] JI, Jian-bing et al. Improvement of leaching process of Geniposide with ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 13, n. 5, p. 455-462, 2006.

- [89] ADHAMI, Vaqar Mustafa; KHAN, Naghma; MUKHTAR, Hasan. Cancer chemoprevention by pomegranate: laboratory and clinical evidence. **Nutrition and cancer**, v. 61, n. 6, p. 811-815, 2009.
- [90] SHARMA, Pooja; MCCLEES, Sarah F.; AFAQ, Farrukh. Pomegranate for prevention and treatment of cancer: an update. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 177, 2017.
- [91] KIM, Nam Deuk et al. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 71, n. 3, p. 203-217, 2002.
- [92] ADAMS, Lynn S. et al. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 980-985, 2006.
- [93] SETTHEETHAM, W.; ISHIDA, T. Study of genotoxic effects of antidiarrheal medicinal herbs on human cells in vitro. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 26, p. 306-310, 1995.
- [94] PHAN, Liem Minh; YEUNG, Sai-Ching Jim; LEE, Mong-Hong. Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. **Cancer Biology & Medicine**, v. 11, n. 1, p. 1, 2014.
- [95] DASH, Bipin C.; EL-DEIRY, Wafik S. Cell cycle checkpoint control mechanisms that can be disrupted in cancer. In: **Checkpoint Controls and Cancer**. Humana Press, 2004. p. 99-161.
- [96] ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S. Cell cycle and cell death in disease: past, present and future. **Journal of Internal Medicine**, v. 268, n. 5, p. 395-409, 2010.
- [97] ATANASOV, Atanas G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.
- [98] MILEO, Anna Maria; MICCADEI, Stefania. Polyphenols as modulator of oxidative stress in cancer disease: new therapeutic strategies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

- [99] SAFARZADEH, Elham; SHOTORBANI, Siamak Sandoghchian; BARADARAN, Behzad. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, n. Suppl 1, p. 421, 2014.
- [100] SINGH, Mithilesh et al. Influence of the solvents on the extraction of major phenolic compounds (punicalagin, ellagic acid and gallic acid) and their antioxidant activities in pomegranate aril. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 9, p. 2070-2077, 2014.
- [101] VENKATARAMANAMMA, D.; ARUNA, P.; SINGH, R. P. Standardization of the conditions for extraction of polyphenols from pomegranate peel. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 5, p. 2497-2503, 2016.
- [102] WISSAM, Zam et al. Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 4, n. Supplement 3, p. 675-682, 2012.
- [103] SHAPIRO, Geoffrey I.; HARPER, J. Wade. Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n. 12, p. 1645-1653, 1999.
- [104] TAZAWA, Yuki et al. Schedule-dependent cytotoxicity of Etoposide and cyclophosphamide in P-glycoprotein-expressing human leukemic K-562 cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 8, p. 1323-1329, 2014.
- [105] WOOD, Gary S.; WU, Jianqiang. Methotrexate and pralatrexate. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 4, p. 747-755, 2015.
- [106] FULDA, Simone. Cell death in hematological tumors. **Apoptosis**, v. 14, n. 4, p. 409-423, 2009.