

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KARINA MAYUMI UEDA

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS PROVENIENTES DE FOLHAS  
DE UVAIA (*Eugenia pyriformis* Cambess.) EMPREGANDO SOLVENTES  
EUTÉTICOS PROFUNDOS (DES)

CURITIBA

2020

KARINA MAYUMI UEDA

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS PROVENIENTES DE FOLHAS  
DE UVAIA (*Eugenia pyriformis Cambess.*) EMPREGANDO SOLVENTES  
EUTÉTICOS PROFUNDOS (DES)

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos R. Mafra  
Coorientadora: Dra. Fabiane Oliveira Farias

CURITIBA

2020

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR  
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

U22e

Ueda, Karina Mayumi

Extração de compostos fenólicos provenientes de folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis Cambess.*) empregando solventes eutéticos profundos (DES) [recurso eletrônico] / Karina Mayumi Ueda. – Curitiba, 2020.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2020.

Orientador: Marcos Rogério Mafra. Coorientadora: Fabiane Oliveira Farias.

1. Uvaia. 2. Antioxidantes. 3. Extração (Química). 4. Solventes. I. Universidade Federal do Paraná. II. Mafra, Marcos Rogério. III. Farias, Fabiane Oliveira. IV. Título.

CDD: 547

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928



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

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **KARINA MAYUMI UEDA** intitulada: **Extração de compostos fenólicos provenientes de folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis Cambess.*) empregando solventes autênticos profundos (DES)**, sob orientação do Prof. Dr. **MARCOS ROGÉRIO MAFRA**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

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

CURITIBA, 09 de Março de 2020.

MARCOS ROGÉRIO MAFRA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

MARCELA BOROSKI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ)

ALINE THEODORO TOCI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DA INTEGRAÇÃO LATINO AMERICANA)

## AGRADECIMENTOS

*À Deus por iluminar o meu caminho, conceder saúde e força para superar todas as dificuldades.*

*Aos meu pais Yassuo Ueda e Rosana Ueda pelo apoio nessa caminhada, amor incondicional e incentivo nas horas de desânimo. Ao meu irmão Rodrigo e minha cunhada Camila que sempre estiveram presentes nos momentos mais difíceis.*

*Ao Prof. Marcos Mafra por todo o conhecimento adquirido, pelo suporte, por acreditar em meu trabalho e possibilitar que essa conquista se concretizasse.*

*Em especial a Fabiane Farias por todo o apoio, conhecimento compartilhado e disponibilidade em ajudar sempre que necessário.*

*Aos amigos do LATOS, Letícia, Fernando, Grazielle, Danielle e José Pedro, pelos bons momentos vividos, trocas de experiências, e todo o apoio ao longo desta trajetória.*

*Aos amigos da vida, Luana, Natalia, Guilherme, Gabriel e Eduardo que tornaram meus dias mais leves, por toda sinceridade e cumplicidade, por estarem presentes em todos os momentos especiais.*

*A Universidade Federal do Paraná e ao Departamento de Engenharia Química em especial ao LATOS que forneceram a estrutura necessária para que esse trabalho fosse realizado.*

*A CAPES pela bolsa concedida.*

*A todos que de alguma forma contribuíram durante a minha trajetória.*

*Não permita que o medo lhe paralise. Dê um passo à frente. A estrada se fará aos poucos, sob seus pés. (Fábio de Melo)*

## RESUMO

A uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.) é uma espécie nativa que exibe alto valor nutricional e farmacológico, interligado a presença de compostos antioxidantes. Suas folhas ainda pouco exploradas, podem ser reaproveitadas com o objetivo de gerar co-produtos de alta qualidade com propriedades bioativas de aplicação industrial. O processo de extração sólido-líquido (ESL) é uma operação unitária que possibilita a obtenção de biocompostos por meio da transferência de massa mediante a aplicação de um solvente. O uso de solventes orgânicos gera aspectos negativos oriundos de sua alta toxicidade, emprego de grandes quantidades de solvente e possível degradação da matriz. Os solventes eutéticos profundos (DES) correspondem a uma classe recente de solventes verdes de baixa toxicidade, com elevado potencial de aplicação, principalmente em matrizes de origem vegetal. Nesse sentido, folhas de uvaia foram selecionadas, caracterizadas por meio de análises físico-químicas e submetidas ao processo de extração, variando as condições de tempo, temperatura e proporção ( $m \cdot v^{-1}$ ) empregando com os DES. Doadores de hidrogênio, água e etanol foram testados a nível de comparação com os DES. Todos os ensaios foram conduzidos em extração do tipo convencional, sendo os melhores resultados, comparados a técnica assistida por ultrassom (UAE). A avaliação dos extratos foi conduzida através das análises de atividade antioxidante, fenólicos totais e flavonoides. O potencial antimicrobiano foi verificado para os melhores DES pelo teste de disco de difusão. Dentre as condições avaliadas, os melhores resultados foram obtidos à 65 °C, com tempo de 150 minutos e proporção 1:30 ( $m \cdot v^{-1}$ ). Os DES formados a partir de cloreto de colina:ácido láctico; cloreto de colina:glicerol e cloreto de colina:1,2 – propanodiol foram selecionados por apresentarem os maiores rendimentos de extração e de atividade antioxidante. Com relação a eficiência de extração o DES formado a partir do ácido láctico exibiu maiores quantidades dos fenólicos totais e atividade antioxidante. Para efeito de comparação foi avaliada a extração empregando DES hidrofóbico, formado a partir de mentol e ácido láctico, sendo observado que o extrato obtido a partir desse solvente apresenta maior conteúdo de flavonoides totais. Sobre a extração conduzida em UAE, houve um aumento significativo em todas as análises realizadas. O DES formado por cloreto de colina:ácido láctico não apresentou diferença significativa entre os tempos de 30 minutos e 90 minutos de extração. Com relação a atividade antimicrobiana, não foi observado halos de inibição significantes para nenhum dos extratos avaliados, indicando que não houve ação antimicrobiana.

Palavras-chave: Solventes verdes. Atividade Antioxidante. Atividade Antimicrobiana. Extração Assistida por Ultrassom.

## ABSTRACT

The uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.) is a native plant that shows high nutritional and pharmacological content, linked to the presence of antioxidant compounds. The leaves still unexplored, can be reused to generate co-products with high-quality correlated to the bioactive properties for industrial applications. The solid-liquid extraction (ESL) is a unit operation that makes it possible to obtain biocompounds by the principle of mass transfer employing a solvent. The use of organic solvents produces negative aspects such as high toxicity, requires large amounts of solvent and degradation of the leave compounds. Deep eutectic solvents (DES) correspond to a novel class of green solvents with low toxicity, high potential applications for plants. Uvaia leaves were selected, characterized by physical-chemical analyzes and submitted to the extraction process, varying the conditions of time, temperature, and ratio ( $m \cdot v^{-1}$ ) using the DES. Donors of hydrogen, water, and ethanol were tested to compare extraction capableness. All tests were conducted in conventional extraction, and the best results were compared to the ultrasound-assisted technique (UAE). The evaluation of the extracts was carried out by the antioxidant activity, total phenolics, and flavonoids analysis. The antimicrobial potential was evaluated for the best DES by the disk diffusion test. Among the conditions appraised, the best results were obtained at 65 ° C, with a time of 150 minutes, and a ratio of 1:30 ( $g \cdot mL^{-1}$ ). DES formed by choline chloride: lactic acid; choline chloride: glycerol and choline chloride: 1,2 - propanediol were selected due to the highest extraction and antioxidant yields. Regarding extraction performance, DES formed from lactic acid exhibited higher amounts of total phenolics and antioxidant activity. For comparison, extraction was conducted using hydrophobic DES, formed by menthol and lactic acid, and it was observed that the extract obtained from this solvent has a higher content of total flavonoids. About the extraction conducted in the UAE, there was a significant improvement in all analyses performed. The DES formed by choline chloride: lactic acid showed no significant difference between the times of 30 minutes and 90 minutes of extraction. Concerning antimicrobial activity, was notice no significant inhibition halos to any of the extracts evaluated, indicating that there was no antimicrobial action.

Keywords: Green solvents. Antioxidant Activity. Antimicrobial Activity. Ultrasound-Assisted Extraction.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FOLHAS DE UVAIA.....	21
FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA BÁSICA DOS ÁCIDOS BENZÓICOS (a), DOS ÁCIDOS CINÂMICOS (b), ÁCIDO O-CUMÁRICO (c) E CUMARINA (d).....	26
FIGURA 3 – DIAGRAMA DE FASE SÓLIDO-LÍQUIDO DE UMA MISTURA EUTÉTICA ENTRE DOIS COMPONENTES.....	33
FIGURA 4 – FLUXOGRAMA GERAL DAS PRINCIPAIS ETAPAS EMPREGADAS DURANTE A OBTENÇÃO DO EXTRATO RICO EM COMPOSTOS FENÓLICOS.....	40
FIGURA 5 – AMOSTRA DE FOLHAS DE UVAIA EM PÓ SUBMETIDAS AO PROCESSO DE SECAGEM. ....	41
FIGURA 6 – PROCESSO DE EXTRAÇÃO CONVENCIONAL COM CONTROLE DE TEMPERATURA E CONSTANTE AGITAÇÃO. ....	43
FIGURA 7 – EQUIPAMENTO DE ULTRASSOM UTILIZADO DURANTE A EXTRAÇÃO. ....	44
FIGURA 8 – RELAÇÃO ENTRE VARIAÇÃO DE TEMPO E CONCENTRAÇÃO DE CFT E DPPH DOS EXTRATOS OBTIDOS DA UVAIA À 65 °C E 1:30 (M·V <sup>-1</sup> ).....	54
FIGURA 9 – RELAÇÃO ENTRE VARIAÇÃO DE TEMPO E CONCENTRAÇÃO DE FT DOS EXTRATOS OBTIDOS DA UVAIA. ....	55
FIGURA 10 – RELAÇÃO ENTRE VARIAÇÃO DE PROPORÇÃO (M·V <sup>-1</sup> ) E CONCENTRAÇÃO DE CFT DOS EXTRATOS OBTIDOS DA UVAIA. ....	56
FIGURA 11 – RELAÇÃO ENTRE VARIAÇÃO DE PROPORÇÃO (M·V <sup>-1</sup> ) E CONCENTRAÇÃO DE DPPH DOS EXTRATOS OBTIDOS DA UVAIA. ....	57
FIGURA 12 – RELAÇÃO ENTRE VARIAÇÃO DE PROPORÇÃO (M·V <sup>-1</sup> ) E CONCENTRAÇÃO DE TF DOS EXTRATOS OBTIDOS DA UVAIA. ....	58
FIGURA 13 – RELAÇÃO ENTRE VARIAÇÃO DE TEMPO E CONCENTRAÇÃO CFT COMPARANDO AS TÉCNICAS UAE E CONVENCIONAL. ....	67

FIGURA 14 – RELAÇÃO ENTRE VARIAÇÃO DE TEMPO E CONCENTRAÇÃO  
DPPH COMPARANDO AS TÉCNICAS UAE E CONVENCIONAL.

..... 68

FIGURA 15 – RELAÇÃO ENTRE VARIAÇÃO DE TEMPO E CONCENTRAÇÃO  
FT COMPARANDO AS TÉCNICAS UAE E CONVENCIONAL... 69

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – LISTA DE REAGENTES.....	36
TABELA 2 – LISTA DE REAGENTES UTILIZADOS DURANTE O PREPARO DOS DES .....	37
TABELA 3 – LISTA DE REAGENTES UTILIZADOS DURANTE O PREPARO DOS DES .....	38
TABELA 4 – LISTA DE REAGENTES UTILIZADOS DURANTE O PREPARO DOS DES .....	39
TABELA 5 – LISTA DE BACTÉRIAS .....	39
TABELA 6 – HBDs LOG $K_{(ow)}$ E RAZÃO MOLAR UTILIZADAS DURANTE A SÍNTESE DOS DES.....	42
TABELA 7 – COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FOLHAS DE UVAIA EM PÓ .....	48
TABELA 8 – CONTEÚDO CFT E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH) DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE UVAIA OBTIDOS A PARTIR DOS DES, TENDO COMO BASE A INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO .....	51
TABELA 9 – TEOR DE CFT, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH E FRAP) E FT OBTIDOS A PARTIR DA EXTRAÇÃO DAS FOLHAS DE UVAIA UTILIZANDO OS DES, SOLVENTES CONVENCIONAIS E PUROS, SEM A PRESENÇA DO CLORETO DE COLINA.....	59
TABELA 10 – TEOR DE CFT, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH E FRAP) E FT DOS EXTRATOS OBTIDOS DAS FOLHAS DE UVAIA EMPREGANDO OS DES CCLA E CCGY, TENDO COMO BASE A INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO DO TEMPO DURANTE A UAE. 64	
TABELA 11 – TEOR DE CFT, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH E FRAP) E FT DOS EXTRATOS OBTIDOS DAS FOLHAS DE UVAIA EMPREGANDO O SOLVENTE CCP, TENDO COMO BASE A INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO DO TEMPO DURANTE A UAE. ..	65
TABELA 12 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE AS BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS DOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DE FOLHAS DE UVAIA EMPREGANDO OS SOLVENTES CCLA, CCGY E CCP.....	72

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO CONVENCIONAIS , VANTAGENS E DESVANTAGENS DE SUAS APLICAÇÕES. ....	28
QUADRO 2 – DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO NÃO CONVENCIONAIS , VANTAGENS E DESVANTAGENS DE SUAS APLICAÇÕES. ....	29

## LISTA DE SIGLAS

ABTS	– ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico
BHA	– 3,3-dietil-hexano;4-metoxifenol
BHT	– 2,6-ditert-butil-4-metilfenol
ChCl	– Cloreto de Colina
DES	– Solventes Eutéticos Profundos ( <i>Deep eutetic solvent</i> )
DPPH	– 1,1-difenil-2-picril-hidrazil
CC <sub>aq</sub>	– Solução aquosa de Cloreto de Colina 50% (m·v <sup>-1</sup> )
CCG	– DES (Cloreto de Colina: Glucose)
CCGY	– DES (Cloreto de Colina: Glicerol)
CCE	– DES (Cloreto de Colina: Etanol)
CCET	– DES (Cloreto de Colina: Etilenoglicol)
CCLA	– DES (Cloreto de Colina: Ácido Lático)
CCS	– DES (Cloreto de Colina: Sorbitol)
CCX	– DES (Cloreto de Colina: Xilitol)
CCXY	– DES (Cloreto de Colina: Xylose)
CCP	– DES (Cloreto de Colina 1,2-Propanodiol)
CFT	– Compostos Fenólicos Totais
EROs	– Espécies Reativas de Oxigênio
ESL	– Extração Sólido-Líquido
FRAP	– Capacidade Antioxidante de Redução do Ferro ( <i>Ferric Reduction Antioxidant Power</i> )
GLY	– Glicerol
FT	– Flavonoides Totais
HBA	– Aceptor de Ligações de Hidrogênio ( <i>Hydrogen Bond Acceptor</i> )
HBD	– Doador de Ligações de Hidrogênio ( <i>Hydrogen Bond Donor</i> )
LA	– Ácido Lático
MAE	– Extração Assistida por Micro-ondas (Microwave-Assisted Extraction)
PROP	– 1,2 – Propanodiol
TBHQ	– 2-terc-butilbenzeno-1,4-diol
TPTZ	– tripiridil-s-triazina

UAE – Extração Assistida por Ultrassom (*Ultrasound-Assisted Extraction*)  
UV – Ultravioleta  
WA – Água

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	16
1.1.	OBJETIVOS	19
1.1.1.	Objetivo geral	19
1.1.2.	Objetivos específicos	19
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	20
2.1.	UVAIA ( <i>Eugenia pyriformis</i> Cambess.): CARACTERÍSTICAS GERAIS E APLICAÇÕES	20
2.2.	COMPOSTOS BIOATIVOS: DEFINIÇÃO E ANTIOXIDANTES	22
2.2.1.	Antioxidantes	23
2.2.2.	Compostos Fenólicos	24
2.2.	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE BIOATIVOS: MATRIZES VEGETAIS	27
2.3.	SOLVENTES EMPREGADOS: EXTRAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS	31
2.3.1.	Solventes Eutéticos Profundos	32
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	36
3.1.	MATERIAL	36
3.2.	MÉTODOS	40
3.2.1.	Preparo da amostra	40
3.2.2.	Caracterização Físico-Química	41
3.2.3.	Síntese e Seleção dos DES	42
3.2.4.	Extração dos compostos fenólicos	42
3.2.5.	Análise estatística dos dados	47
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	48
4.1.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	48
4.2.	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO	50
4.2.1.	Seleção dos DES	50
4.2.2.	Avaliação do tempo e proporção (m/v)	53
4.2.3.	Extração empregando etanol, água, HBDs e solução aquosa de HBA58	
4.2.4.	Determinação das melhores condições de extração	61
4.2.5.	Comparação entre os métodos de extração: convencional e assistida por ultrassom	63
4.3.	Avaliação da atividade antimicrobiana	70

5.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	73
6.	CONCLUSÕES.....	74
	REFERÊNCIAS .....	75

## 1. INTRODUÇÃO

Recentemente os compostos antioxidantes tem atraído a atenção dos consumidores devido aos benefícios de sua ingestão, capazes de reduzir o risco de doenças degenerativas e diminuir o estresse oxidativo no corpo humano, além de gerar outros benefícios relacionados ao retardamento de processos de degradação em alimentos (SHAHIDI, 2015). As vantagens interligadas aos antioxidantes, favorecem seu uso em diversos setores como indústrias farmacêuticas, químicas e alimentícias.

As formas sintéticas de antioxidantes comumente utilizadas na indústria podem gerar danos à saúde em relação a produção de compostos cancerígenos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008). Neste contexto, é relevante a quantidade de estudos que exploram as propriedades bioativas presentes em matrizes de origem vegetal provenientes de folhas e frutos assim como suas formas de uso. As aplicações podem ser as mais diversas possíveis, como suplementos, medicamentos, aditivos e conservantes alimentares.

Dentre as principais substâncias antioxidantes, destacam-se os compostos fenólicos, encontrados em matrizes vegetais, os quais além de exibir atividade antioxidante, apresentam diversas propriedades de interesse em sua composição como atividade antimicrobiana. Nesse contexto, algumas espécies nativas brasileiras exibem elevado potencial de exploração farmacêutico, cosmético e alimentício, com ênfase para os resíduos de origem vegetal, que exibem características nutricionais de alto valor agregado.

A uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.) é uma espécie nativa da mata atlântica, ainda pouco explorada, mas que exibe capacidade antioxidante devido à presença de compostos bioativos. Estudos indicam que seus frutos apresentam compostos fenólicos, além de vitaminas, em sua composição, assim como as folhas que também apresentam propriedades antioxidantes. Apesar disso, os estudos disponíveis ainda são escassos.

Os compostos fenólicos podem ser obtidos através de óleos essenciais e extratos vegetais, mediante a aplicação de técnicas e solventes, as quais devem ser capazes de preservar a atividade das biomoléculas. Os solventes verdes como a água, os líquidos iônicos (ILs) e os solventes eutéticos profundos (DES), demonstram potencial de aplicação devido à alta compatibilidade de extração com as moléculas de

interesse além de suprir dificuldades interligadas com a alta toxicidade exibidas pelos solventes convencionais.

A água apresenta baixo custo, boa seletividade e fácil acesso, em contrapartida, sua extração é restrita a determinadas faixas de temperatura (DOBLE et al., 2007). Os LIs apresentam propriedades únicas devido a possibilidade de combinação entre diferentes ânions e cátions gerando uma extração de alta seletividade com os biocompostos presentes na matriz, porém o custo de aplicação é elevado principalmente em dimensões industriais (BRENNECKE; MAGINN, 2001).

Os DES são caracterizados pela formação de fortes ligações de hidrogênio estabelecidas entre compostos doadores (HBD, do inglês “*Hydrogen Bond Donnor*”) e receptores de hidrogênio (HBA, do inglês “*Hydrogen Bond Acceptor*”). Essa característica leva a um grande desvio da idealidade, o que promove um abaixamento “profundo” da temperatura de fusão com relação a solução ideal. Esse comportamento tende a possibilitar que a mistura seja líquida mesmo em baixas temperaturas (MARTINS; PINHO; COUTINHO, 2019).

ABBOTT e colaboradores (2003) reportaram que a mistura entre sais quaternários de amônio como o cloreto de colina (ChCl) (HBA) e a ureia (HBD) produzem um solvente líquido a temperatura ambiente com características diferenciadas. O uso de um HBA como o ChCl e um HBD como a ureia, o glicerol e o ácido oxálico descrevem um processo de fácil síntese e geralmente atóxico, obtendo um DES de características físico-químicas favoráveis ao processo de extração (ZHANG et al., 2012). Recentemente, estudos demonstram resultados promissores para o uso dos DES na extração de diversos compostos de diferentes matrizes com ênfase nos alimentos de origem vegetal.

Não menos importante do que o solvente, a técnica (operação unitária) exibe grande influência no rendimento. Técnicas convencionais como maceração, *Soxhlet* e prensagem podem apresentar baixa eficiência no processo de extração, porém podem ser consideradas simples e responsáveis pela diminuição de custo, tornando-as economicamente viável. Algumas técnicas como a extração sólido-líquido promovida por meio do aquecimento e agitação podem oferecer elevada eficiência de extração se comparado com técnicas não-convencionais.

Visando otimizar o processo em questão, a extração assistida por ultrassom (UAE, do inglês “*Ultrasound Assisted Extraction*”) tem demonstrado ser uns dos métodos de elevada aplicabilidade, devido a sua facilidade de uso, mínimo risco de

contaminação da amostra, altos rendimentos de extrato e obtenção de melhores propriedades com relação a atividade antioxidante (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011). O emprego de técnicas de extração eficientes combinadas com solventes verdes geram uma otimização do processo de obtenção de extratos ricos em biomoléculas.

Com a finalidade de avaliar o potencial de extração de matrizes vegetais, bem como oferecer uma destinação dos resíduos vegetais de forma a se aproveitar de seus benefícios, o presente trabalho tem como objetivo potencializar o processo de extração de compostos antioxidantes obtidos a partir de folhas de uvaia, considerando fatores como o emprego de solventes verdes (DES), tempo e temperatura de extração, proporção entre amostra e solvente e o efeito da extração sólido-líquido em batelada a partir da combinação entre aquecimento e agitação e do emprego do ultrassom. Adicionalmente, avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos obtidos.

## 1.1. OBJETIVOS

### 1.1.1. Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo potencializar a extração e avaliar compostos bioativos extraídos a partir de folhas de Uvaia (*Eugenia pyriformis* C.) empregando solventes eutéticos profundos (DES).

### 1.1.2. Objetivos específicos

- Caracterizar físico e quimicamente folhas de Uvaia (desidratadas e em pó);
- Preparar os DES utilizando diferentes aceptores e doadores de hidrogênio;
- Selecionar DES com melhor capacidade de extração de compostos antioxidantes;
- Avaliar parâmetros operacionais de extração sólido-líquido em batelada (tempo, temperatura e razão sólido: soluto) na extração de compostos fenólicos empregando os DES;
- Comparar o potencial de extração dos DES frente aos solventes convencionais e doadores de hidrogênio puros (sem a presença do cloreto de colina);
- Empregar a extração assistida por ultrassom a fim de compará-la com o método convencional (extração sólido-líquido em batelada);
- Determinar o potencial antioxidante dos extratos obtidos via metodologias *in vitro* de compostos fenólicos totais (Folin Ciocalteau), flavonoides e atividade antioxidante (DPPH e FRAP);
- Determinar a atividade antimicrobiana dos extratos com maior potencial através da técnica de disco difusão.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo serão abordados os seguintes temas: aspectos gerais da Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.); compostos bioativos com ênfase na atividade antioxidante proveniente dos compostos fenólicos; processos de extração, englobando técnicas convencionais e modernas; e por fim, solventes usualmente empregados e os solventes verdes com ênfase nos líquidos iônicos e nos solventes eutéticos profundos.

### 2.1. UVAIA (*Eugenia pyriformis* Cambess.): CARACTERÍSTICAS GERAIS E APLICAÇÕES

O Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades disponíveis no planeta, sendo grande parte localizada na mata Atlântica. Algumas espécies de frutas e folhas com alto valor nutricional ainda são exploradas e consumidas localmente. A família Myrtaceae pode ser apontada como uma das mais importantes no Brasil, correspondendo a aproximadamente 121 gêneros e mais de 3800 espécies (PASCOAL; SALVADOR, 2011).

Pertencente à família Myrtaceae, o gênero *Eugenia* exibe elevado potencial econômico e farmacológico, devido ao seu alto valor nutricional principalmente interligado a atividade antioxidante. Grande parte dos estudos disponíveis estão concentrados na *E. uniflora* L. popularmente conhecida como pitanga. A uvaia (*E. pyriformis* Cambess.) está inserida neste gênero que apresenta cerca de 400 espécies conhecidas, podendo ser encontrada em toda a extensão sul, sudoeste e nordeste do Brasil (JACOMINO et al., 2018; PASCOAL; SALVADOR, 2011; SARDI et al., 2017).

A uvaia apresenta porte médio e folhas de 4 – 7 cm de comprimento, conforme FIGURA 1. Suas flores são brancas e hermafroditas e os frutos apresentam coloração amarela ou laranja, sabor ácido, aroma agradável, principalmente utilizados durante a preparação de sucos, geleias e doces (JACOMINO et al., 2018). Trata-se de uma planta pouco disseminada, geralmente encontrada em cultivos domésticos.

FIGURA 1 – FOLHAS DE UVAIA



FONTE: Gerson Lopes (2011).

Estudos encontrados na literatura relacionados a *E. pyriformis* C. concentram-se no valor nutricional de seus frutos, com destaque para a presença de biocompostos com atividade antioxidante. Pereira e colaboradores (2012) verificaram o potencial antioxidante de frutas nativas brasileiras pertencentes a família Myrtaceae. Através dos resultados obtidos, constataram que os frutos da uvaia apresentam elevados teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante, com concentrações próximas as outras espécies estudadas como guabiroba e a guava. Sobre o conteúdo de carotenoides e vitamina A, a uvaia apresenta teores superiores com relação as espécies comparativas.

Haminiuk e colaboradores (2014) quantificaram os compostos fenólicos e flavonoides em extratos de *E. pyriformis* C. obtidos através de seus frutos, utilizando diferentes solventes orgânicos. Como resultado desta pesquisa, o ácido gálico e a quercetina apresentaram maiores concentrações, seguido do ácido clorogênico e miricetina. da Silva e colaboradores (2019), verificaram a composição química, nutricional e a presença de compostos bioativos nos frutos de uvaia e verificaram significativa capacidade antioxidante proveniente dos compostos fenólicos além de teores consideráveis de fibras e minerais como Fe, Cu e Mn em sua composição.

Os resíduos de origem vegetal como as folhas podem ser explorados com objetivo de produzir co-produtos como os extratos com propriedades bioativas e biodegradáveis de aplicação industrial. A obtenção de compostos bioativos a partir de

óleos essenciais e extratos representam uma alternativa adequada capaz de atuar de forma eficiente como aditivo alimentar de alto valor agregado, além de gerar produtos responsáveis por suprir as necessidades nutricionais básicas para saúde do corpo humano (LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROEM, 2003).

A respeito de outras espécies do gênero *Eugenia*, encontram-se estudos a partir de folhas de *E. uniflora* L., popularmente conhecida como Pitanga, com a finalidade de obter óleos essenciais ricos em atividade antioxidante e potencial antimicrobiano. No estudo em questão, foram testados a atividade de inibição antimicrobiana frente a dois patógenos de grande importância: *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (VICTORIA et al., 2012). Outros trabalhos sobre pitanga são interligados a produção de extratos ricos em carotenóides e antioxidantes, com ênfase aos compostos fenólicos, utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico, água e etanol (DA CUNHA et al., 2016; FILHO et al., 2008; GARMUS et al., 2014; MARTINEZ-CORREA et al., 2011).

A espécie *E. involucrata* também tem sido estudada. Ciarlini; Marangoni e Bolzan (2017), utilizaram as técnicas de CO<sub>2</sub> supercrítico e Soxhlet para a produção de extratos ricos em compostos fenólicos. Neste estudo os autores concluíram que a extração realizada por *Soxhlet* foi considerada de maior eficiência com relação ao rendimento e atividade antioxidante presente nos extratos. Barzotto e colaboradores (2019) também analisaram o potencial da extração supercrítica em extratos provenientes da *E. involucrata*, adicionalmente, verificaram que há presença de  $\alpha$ -tocoferol em sua composição.

## 2.2. COMPOSTOS BIOATIVOS: DEFINIÇÃO E ANTIOXIDANTES

Os compostos bioativos podem ser encontrados em diversas matrizes vegetais, como plantas, frutas, legumes e grãos integrais. São responsáveis por suprir parte das necessidades nutricionais básicas do corpo humano (BLOOD, 2018). Em sua composição química observa-se a presença de alguns peptídeos, vitaminas, ácidos graxos, flavonoides e fitoesteróis. Alguns destes compostos estão disponíveis nos alimentos e exibem atividade antioxidante, responsável por preservar e/ou retardar processos de deterioração (ZHONG; XIAO, 2009). Outros compostos bioativos são responsáveis por atividades terapêuticas interligadas a ação antidiabética, antimicrobiana, anti-inflamatórias e anticancerígena por exemplo (NEGI; SINGH; RAWAT, 2011). Nos tópicos a seguir, serão abordadas alguns conceitos e

aplicações dos antioxidantes enfatizando o potencial dos compostos fenólicos frente ao combate e prevenção de doenças, e funcionalidade no corpo humano.

### 2.2.1. Antioxidantes

Halliwell (2009) define os antioxidantes como substâncias que se apresente em baixas concentrações, quando comparada ao substrato oxidável, e que possua atividade significativa de prevenção ou de retardamento da oxidação desse substrato. O termo substrato oxidável engloba toda molécula orgânica ou inorgânica encontrada *in vivo*.

Cerca de 1 a 3% do oxigênio que inspiramos se transforma nas espécies reativas de oxigênio (EROs) que inclui o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), formado a partir da redução do  $O_2$  e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), produto da redução ou dismutação do  $O_2^{\bullet-}$ . As duas formas são consideradas quimicamente reativas e quando colocadas em contato com íons metálicos de transição (principalmente Fe e Cu) tendem a formar espécies de radicais de elevada reatividade, responsável por gerar danos ao corpo humano. A ingestão de antioxidantes é essencial para retardar ou inibir as alterações causadas pelas EROs (HALLIWELL, 2009).

Em alimentos, algumas reações de oxidação são consideradas responsáveis por efeitos negativos, como a degradação de lipídios, vitaminas e pigmentos, perda do valor nutricional e alterações sensoriais causadas pela produção de sabores indesejáveis no alimento. O emprego de técnicas de controle das reações de oxidação é fundamental para a preservação do produto final (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008).

O uso dos antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos é expressivo devido as suas características de alta eficiência, baixo custo e elevada estabilidade. 3,3-dietil-hexano;4-metoxifenol (BHA), 2,6-diterc-butil-4-metilfenol (BHT) e 2-terc-butilbenzeno-1,4-diol (TBHQ) são os principais antioxidantes sintéticos utilizados para a preservação dos alimentos na indústria. Todavia, pesquisas demonstram que algumas formas sintéticas são responsáveis pela produção de compostos tóxicos e carcinogênicos, prejudiciais à saúde (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008).

Por outro lado, muitas substâncias de ocorrência natural obtidas a partir da extração de matrizes vegetais apresentam elevada atividade antioxidante e propriedade atóxica. Os antioxidantes naturais como o ácido ascórbico, os

carotenóides e os compostos fenólicos são substâncias de elevado valor nutricional, agregando qualidade ao produto final (BREWER, 2011; DEVATKAL; NARSAIAH; BORAH, 2010).

Estudos disponíveis na literatura buscam analisar o potencial de extração de matrizes de origem vegetal, conciliando técnicas e solventes que otimizem o processo e tornem economicamente viável sua obtenção. Hamed e colaboradores (2019) verificaram o potencial antioxidante de folhas *Moringa oleífera* com ênfase na obtenção de flavonoides a partir da extração assistida por ultrassom. Por meio dos resultados obtidos, os autores sugerem que o extrato apresenta capacidade de aplicação em alimentos funcionais. Irakli; Chatzopoulou; Ekateriniadou (2018) realizam uma pesquisa similar, utilizando a mesma técnica de extração com intuito de otimizar o processo de obtenção de extratos provenientes de folhas de oliva.

Sim; Jess Ong e Nyam (2019) analisaram o efeito da técnica assistida por ultrassom pulsada durante a extração de folhas de *Kenaf (Hibiscus cannabinus L.)* utilizando água, metanol, etanol e acetona. No estudo em questão, os autores indicaram que o alto potencial antioxidante do extrato se apresenta como uma fonte promissora de antioxidante natural.

Grande parte dos trabalhos publicados recentemente buscam o aproveitamento de resíduos de origem vegetal, partindo do princípio que a maioria das plantas são constituídas de diversos bioativos de elevada aplicabilidade na indústria de alimentos. Rodrigues e colaboradores (2019) verificaram o potencial de recuperação dos compostos fenólicos provenientes de resíduos de sementes de mamão a partir do emprego de extração subcrítica. Os resultados obtidos indicaram alto potencial antioxidante, sendo identificada a presença de 30 compostos fenólicos diferentes em sua composição. Outros resíduos como os oriundos da uva são amplamente explorados devido à alta concentração de biocompostos (CVJETKO BUBALO et al., 2016). Drevelegka e Goula (2020) verificaram uma otimização do processo de recuperação de compostos fenólicos do bagaço de uva a partir da extração assistida por ultrassom e por micro-ondas, empregando solventes verdes.

### 2.2.2. Compostos Fenólicos

De acordo com Quideau e colaboradores (2011), os compostos fenólicos são definidos como metabólicos secundários derivados exclusivamente dos

fenilpropanóides e policetídeos originados a partir da via do ácido chiquímico e que apresentam um anel aromático com um ou mais grupo hidroxila em sua estrutura (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005).

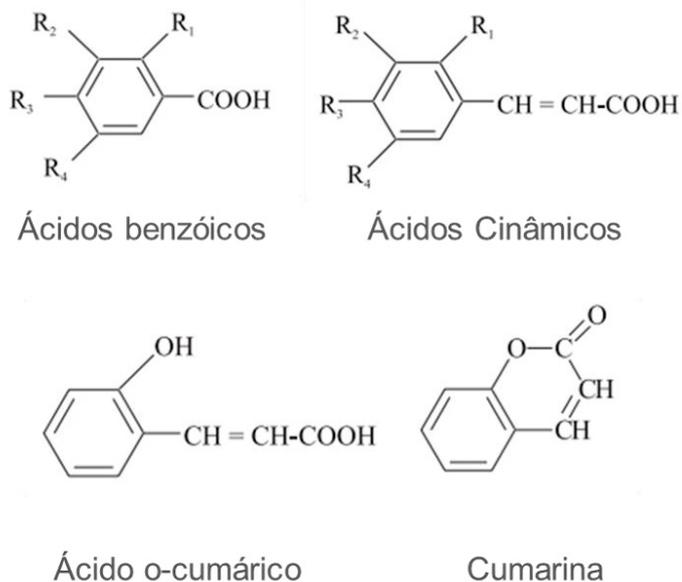
Os compostos fenólicos são amplamente encontrados em matrizes vegetais, sendo que alguns compostos fenólicos podem ser específicos a um determinado órgão da planta ou estágio de desenvolvimento. Mais de 8000 estruturas de polifenóis, incluindo mais de 4000 flavonoides identificados, considerado uma das maiores classes de compostos fenólicos encontrados em plantas (CHEYNIER, 2012; NACZK; SHAHIDI, 2004; PETERSON; DWYER, 1998). Em alimentos, os compostos fenólicos são responsáveis por conferir diversas propriedades benéficas interligadas a alterações desejáveis como a adstringência, cor, aroma e principalmente, atividade antioxidante (PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005; SHAHIDI; NACZK, 2003).

As funções biológicas importantes para o organismo estão interligadas a sua atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e cardioprotetora, além de desempenharem papel de prevenção de doenças, incluindo câncer (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; CARINA BILUCA et al., 2019; REBOREDO-RODRÍGUEZ et al., 2018; YAKHLEF et al., 2018; ZHENG et al., 2017). Devido aos inúmeros benefícios provenientes dos compostos fenólicos, estudos em relação a caracterização e quantificação tornam-se cada vez mais relevantes para a indústria de alimentos (SHAHIDI; NACZK, 2003).

Os compostos fenólicos exibem uma ampla diversidade de estruturas incluindo moléculas simples (ácido gálico e ácido caféico) e compostos altamente polimerizados como as procianidinas classificadas em: simples fenóis, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos hidrossolúveis e condensados, ligninas e lignanas (CHEYNIER, 2012; SHAHIDI; NACZK, 2003).

O mecanismo de atuação antioxidante ocorre por meio do sequestro de radicais e como quelantes de metais nas etapas de iniciação e propagação do processo oxidativo. Os ácidos fenólicos responsáveis pela conferência de propriedades antioxidantes podem ser divididos em três grupos: compostos por ácidos benzóicos, ácidos cinâmicos, as cumarinas derivadas do ácido cinâmico (FIGURA 2) (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992).

FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA BÁSICA DOS ÁCIDOS BENZÓICOS (a), DOS ÁCIDOS CINÂMICOS (b), ÁCIDO O-CUMÁRICO (c) E CUMARINA (d)



FONTE: Ramalho e Jorge (2006).

Acerca do perfil fenólico das folhas pertencentes ao gênero *Eugenia*, Siebert e colaboradores (2017), analisaram extratos hidroalcoólicos provenientes da *E. brasiliensis* através de cromatográfica líquida de alta eficiência (HPLC). Como resultado, constataram a presença dos seguintes compostos fenólicos: catequina, miricetina, isoquercitina, rutina, quercetina, galangin e apigenina. Já as folhas de *E. uniflora* L. apresentam essencialmente compostos fenólicos como ácido gálico, miricetina e quercetina (SOBEH et al., 2019).

## 2.2. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE BIOATIVOS: MATRIZES VEGETAIS

A extração sólido-líquido (ESL) pode ser considerada como uma operação unitária amplamente utilizada na indústria de alimentos (PINELO; SINEIRO; NÚÑEZ, 2006). Trata-se de um processo de transferência de massa em que os compostos químicos de interesse são extraídos por meio do contato com o solvente. O objetivo desse método é empregar pequenas quantidades de solvente a fim de obter um extrato altamente concentrado (BERK, 2009).

As formas convencionais de ESL englobam as técnicas de arraste, prensagem, maceração e Soxhlet (QUADRO 1). Dentre as técnicas não convencionais destacam-se a extração empregando fluido supercrítico e as extrações, assistida por micro-ondas (MAE, do inglês "*Microwave Assisted Extraction*") e por ultrassom (UAE, do inglês "*Ultrasound Assisted Extraction*") conforme QUADRO 2 (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013). A eficiência do método depende da escolha do solvente, da técnica, tempo de extração, temperatura, pH de operação e presença de substâncias interferentes (ZHANG; LIN; YE, 2018)

QUADRO 1 – DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO CONVENCIONAIS, VANTAGENS E DESVANTAGENS DE SUAS APLICAÇÕES

<b>Técnica</b>	<b>Descrição</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>	<b>Fonte</b>
Maceração	A amostra é colocada em contato com o solvente e macerada.	Técnica simples e de baixo custo.	Baixa eficiência de extração; longos períodos de extração; grandes quantidades de solventes.	ZHANG; LIN; YE (2018).
Soxhlet	Extração a quente, baseada no princípio do refluxo em que a extração ocorre continuamente.	Baixo custo; simplicidade de operação; não é necessário filtrar após a extração.	Longos períodos de extração; altas temperaturas; grandes quantidades de solventes.	CAMEL (2001); ZHANG; LIN; YE (2018).
Extração sólido-líquido (calor/agitação)	Aplicação de calor de forma indireta e agitação constante.	Baixo custo; simplicidade de operação; pequenas quantidades de solventes.	Rendimento inferior; demanda períodos maiores de extração do que as técnicas não-convencionais.	ZHANG; LIN; YE (2018).

FONTE: A autora (2020).

QUADRO 2 – DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO NÃO CONVENCIONAIS, VANTAGENS E DESVANTAGENS DE SUAS APLICAÇÕES

Técnica	Descrição	Vantagens	Desvantagens	Fonte
Fluído Supercrítico	Baseada no uso de solventes em temperaturas e pressões próximas ou acima do ponto crítico. Ocorre por meio de radiações não ionizantes que induzem o movimento molecular gerando energia que age diretamente na molécula através de condução iônica e rotação de dipolos.	Alta seletividade e segurança e ao estado inerte da maioria dos solventes utilizados. Redução do tempo de extração e da quantidade de solventes; maiores rendimentos e redução da geração de resíduos.	Dificuldade em extrair compostos polares; rendimento é baixo. Altas potências favorece a degradação dos compostos monoterpênicos, compostos presentes em alguns óleos essenciais.	MAUL; WASICKY; BACCHI (1996); SMITH (1961). CAMEL (2001); HASHEMI-MOGHADDAM et al., (2013).
Assistida por ultrassom	Baseada no princípio de formação de cavitações geradas a partir de ciclos alternados em meio líquido de rarefação e compressão	Tecnologia limpa; pequenas quantidades de solventes empregadas; curto tempo de extração; alta reprodutibilidade; simplicidade de manipulação e de processamento.	Degradação de alguns biocompostos como antocianinas e o licopeno e modificação nos parâmetros físico-químicos.	LUQUE-GARCÍA; LUQUE DE CASTRO (2003); CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN (2011); CHEMAT et al., (2017).

FONTE: A autora (2020).

DENG et al e colaboradores (2017), compararam a eficiência das técnicas de ME e UAE durante a obtenção de um extrato rico em compostos fenólicos presentes nas folhas de oliva. A partir dos resultados, os autores ressaltam que a UAE apresenta maior eficiência de extração, utilizando pequenas quantidades de solvente e menores tempo e temperatura de extração.

Com relação ao uso do *Soxhlet*, Mohammadpour e colaboradores (2019), desenvolveram um estudo de otimização de extração de óleo essencial proveniente da *Moringa peregrina* comparando as técnicas de UAE e *Soxhlet*. Como conclusão deste trabalho, os autores constataram maiores valores de atividade antioxidante para o extrato obtido por UAE, além de maiores rendimentos, 53% para UAE (30 minutos) e 43% utilizando *Soxhlet*, após 11h de extração.

Cao e colaboradores (2018) compararam diferentes métodos de extração sólido-líquido durante a obtenção de extratos provenientes de folhas de *Ginkgo biloba*. Os métodos foram baseados no aquecimento de forma indireta (célula encamisada com banho termostático), além de UAE. Os autores verificaram pequena diferença no rendimento entre os métodos de extração, principalmente em ensaios realizados a 45 °C, demonstrando que técnicas consideradas mais simples podem apresentar eficiência igual ou superior a técnicas não-convencionais.

O uso de novas técnicas de radiação (micro-ondas e ultrassom) demonstram alta eficiência, rapidez e simplicidade durante a extração de compostos bioativos. Hu e colaboradores (2019) avaliaram o potencial de extração de óleo essencial rico compostos fenólicos provenientes *Camelia sinensis*. Estudos semelhantes com a casca de limão e flores de hibisco também foram desenvolvidos. Nos estudos citados, os autores constaram elevado potencial das técnicas combinadas com solventes adequados para cada matriz. Durante a extração dos compostos fenólicos presentes no limão observou-se que a técnica de ultrassom foi a mais eficaz em relação a técnica de micro-ondas. Em relação a obtenção do óleo essencial proveniente do chá, observou-se melhores propriedades físico-químicas e maiores componentes bioativos a partir da extração com micro-ondas se comparado com o *Soxhlet* (CASSOL; RODRIGUES; ZAPATA NOREÑA, 2019; HU et al., 2019; RODSAMRAN; SOTHORNVIT, 2019).

Estudos realizados com frutos de jussara e mirtilo constataram que o uso do ultrassom promove maior eficiência se comparado com métodos tradicionais em relação a extração de compostos fenólicos, reduzindo a quantidade de solvente

utilizado e o tempo de extração (ROCHA et al., 2018). Em relação a extração de óleo essencial proveniente da *Moringa peregrina*, observou-se que além das características em relação a otimização do processo, o uso desta técnica possibilitou uma redução dos valores de peróxidos e valores relativamente maiores em relação extração convencional sobre os parâmetros de atividade antioxidante, compostos fenólicos e valor de iodo (MOHAMMADPOUR et al., 2019).

### 2.3. SOLVENTES EMPREGADOS: EXTRAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS

A eficiência do processo de extração está interligada com a escolha do solvente adequado. Os parâmetros como tempo e temperatura de extração, proporção de solvente: amostra, matriz, tamanho da molécula de interesse e compostos bioativos presentes, devem ser analisados durante a escolha do solvente. Solventes convencionais como a água e os orgânicos como o etanol, metanol, acetona e hexano são amplamente utilizados durante a extração de biocompostos (GARCÍA et al., 2016; MARSH et al., 2002).

O uso de solventes orgânicos apresenta alta aplicabilidade, eficiência e facilidade de uso. Porém seu emprego também gera aspectos negativos decorrentes de sua alta toxicidade, necessidade de grandes quantidades de solvente, maior resistência à transferência de massa, além de originar possíveis degradações na matriz (SAFDAR et al., 2017). A busca pela substituição dos solventes orgânicos pelos verdes ocorre principalmente devido a demanda por substâncias atóxicas, recicláveis e biodegradáveis (CVJETKO BUBALO et al., 2014).

A água é um dos solventes mais utilizados durante a extração de compostos bioativos. Apresenta vantagens interligadas a fácil acessibilidade, baixo custo, boa seletividade e influência das ligações de hidrogênio durante o processo de transferência de massa. Por outro lado, o uso da água torna a extração restrita a determinadas faixas de temperatura e sua capacidade calorífica pode originar um processo de grande consumo de energia (DOBLE et al., 2007).

De forma a atender a demanda por solventes ecológicos e também as limitações da água, os líquidos iônicos surgiram para substituir os solventes orgânicos e voláteis presentes. Os ILs são sais orgânicos cujos cátions e ânions apresentam diferentes características químicas e físicas e ponto de fusão abaixo de 100°C. As diferentes combinações possíveis entre cátions e ânions originam diferentes ILs que

podem ser aplicados em diversos sistemas principalmente em razão da baixa pressão de vapor, excelente estabilidade térmica e química e solubilidade de substâncias orgânicas (BRENNECKE; MAGINN, 2001; NULWALA; MIRJAFARI; ZHOU, 2018).

Por outro lado, alguns ILs apresentam elevado custo, síntese complexa, baixa biodegradabilidade biológica e necessidade de purificação. Além dos fatores citados, um *scale-up* para dimensões industriais é praticamente inviável (HUANG et al., 2019; KUDŁAK; OWCZAREK; NAMIEŚNIK, 2015; ŞAHIN, 2019; THUY PHAM; CHO; YUN, 2010). O emprego dos DES pode solucionar algumas das adversidades citadas acima, principalmente pela simplicidade de síntese e baixa toxicidade (CRAVEIRO et al., 2016; DAI et al., 2013c).

### 2.3.1. Solventes Eutéticos Profundos

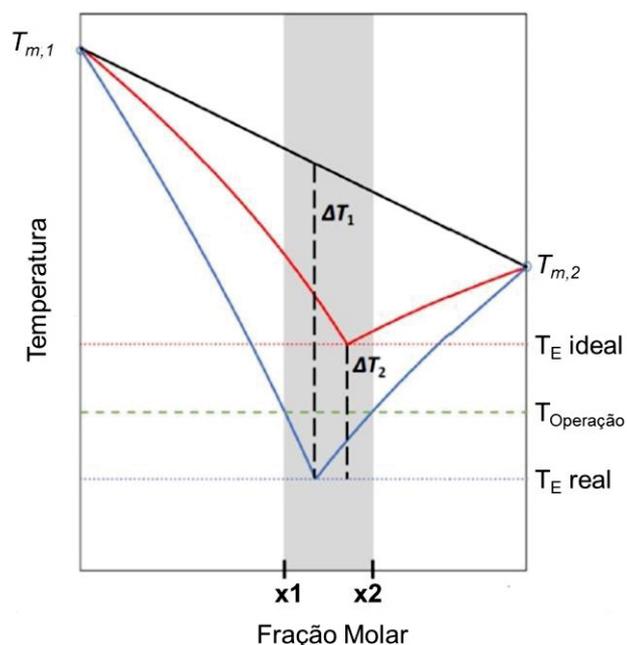
O termo solventes eutéticos profundos foi introduzido pela primeira vez ao descrever a associação entre duas moléculas sendo uma receptora (HBA) e a outra doadora de hidrogênio (HBD) através de ligações de hidrogênio (ABBOTT et al., 2003). Os sais quaternários de amônio, como o cloreto de colina (ChCl), são geralmente utilizados como receptor de hidrogênio e as aminas, amidas, álcoois, ácidos carboxílicos entre outros compostos como doadores de hidrogênio (DOMÍNGUEZ DE MARÍA; MAUGERI, 2011; KUDŁAK; OWCZAREK; NAMIEŚNIK, 2015; RADOŠEVIĆ et al., 2015). Desde o surgimento dos DES houve um crescente interesse em seu estudo e um aumento de publicações, sendo que em 2019 foram encontrados 914 artigos a respeito do tema (SCOPUS DATABASE, 2018).

O ChCl é considerado um dos sais mais utilizados durante a síntese dos DES principalmente por apresentar características como baixo custo, não toxicidade e fácil obtenção (a partir de reservas fósseis ou por meio de extração de biomassa) além de ser considerado biodegradável. Em combinação com HBDs adequados como ureia, ácidos carboxílicos e polifenóis renováveis é capaz de formar um DES (ZHANG et al., 2012).

Após a introdução dos solventes eutéticos profundos, algumas definições foram revisadas. Atualmente os DES são considerados misturas e não substâncias puras. O termo “profundo” refere-se ao abaixamento da temperatura de fusão em relação ao comportamento previsto pela hipótese de solução ideal. Desta forma, o abaixamento da temperatura deve ser definido como a diferença entre a temperatura

de fusão da solução ideal e a temperatura de fusão da solução real do ponto eutético, como descrito na FIGURA 3 (MARTINS; PINHO; COUTINHO, 2019).

FIGURA 3 – DIAGRAMA DE FASE SÓLIDO-LÍQUIDO DE UMA MISTURA EUTÉTICA ENTRE DOIS COMPONENTES



FONTE: Martins, Pinho e Coutinho (2019).

LEGENDA:  $\Delta T_1$ : diferença entre a combinação linear dos pontos de fusão dos componentes puros e o ponto eutético real ( $T_E$  real);  $\Delta T_2$ : diferença entre o ponto eutético ideal ( $T_E$  ideal) e o real ( $T_E$  real);  $T_{m,1}$ : temperatura da mistura 1;  $T_{m,2}$ : temperatura da mistura 2.

Os parâmetros relativos à toxicidade e caráter ecológico dependem exclusivamente da mistura formada e não dos compostos puros. Em relação a proporção estequiométrica entre HBA e HBD, Abbott e colaboradores (2003), introduziram a ideia de que a composição do ponto eutético está interligada à formação do complexo e que as proporções são fixas entre HBA e HBD. Porém a composição do ponto eutético depende das propriedades de fusão dos dois componentes e não somente das interações entre HBA e HBD, podendo assumir diferentes valores estequiométricos (MARTINS; PINHO; COUTINHO, 2019).

Em relação as características físico-químicas dos DES, a densidade e a viscosidade são parâmetros de extrema importância durante a sua síntese. A maioria dos DES apresentam como característica densidade superiores aos seus componentes puros e da água, o que pode estar atribuída a organização de suas moléculas (KHANDELWAL; TAILOR; KUMAR, 2016; ZHANG et al., 2012).

A viscosidade é vista como uma propriedade de elevada importância durante a síntese dos DES pois influencia diretamente na transferência de massa durante a extração. A viscosidade dos DES em temperaturas próximas a ambiente é elevada devido as ligações de hidrogênio entre HBD e HBA, forças de Van der Waals e interações eletrostáticas. Este fator pode variar de acordo a natureza de seus componentes e o teor de água presente. A adição de quantidades de água, como observado para o DES formado a partir de ureia e ChCl (até 15% de água) é capaz de diminuir a viscosidade, em controvérsia, também é responsável pelo enfraquecimento das ligações de hidrogênio podendo desestabilizar as ligações até mesmo promover a sua quebra. O aumento da temperatura também é capaz de diminuir a viscosidade (ABBOTT et al., 2004; DAI et al., 2013a; HAMMOND; BOWRON; EDLER, 2017; KHANDELWAL; TAILOR; KUMAR, 2016).

Os solventes eutéticos profundos apresentam potencial em diversas áreas, com destaque para as áreas alimentícia, de fármacos e cosméticos. Estudos envolvendo extração (JIAO et al., 2015), separação de biomoléculas (HUANG et al., 2019) e sua aplicação em reações orgânicas (LIU et al., 2015) e durante a síntese de polímeros, (CARRIAZO et al., 2012) são exemplos promissores de seu uso. Outros exemplos estão relacionados ao seu uso em processos de biotransformações como conversão de biomassa lignocelulósica em combustível (SATLEWAL et al., 2018), extração de biomoléculas com ênfase para os compostos fenólicos (BARBIERI et al., 2020; CAO et al., 2018; EL KANTAR et al., 2019; ZHOU et al., 2018), modificação de nanopartículas (KARIMI; SHABANI; DADFARNIA, 2016), durante a estabilização de pigmentos naturais provenientes do açafraão (DAI; VERPOORTE; CHOI, 2014).

Observa-se um crescente número de publicações com relação ao uso dos DES durante a extração de biomoléculas em matrizes com atividade medicinal, bactericida e de preservação de alimentos. A extração de biocompostos como flavonoides provenientes do *Ginkgo biloba* (CAO et al., 2018), isoflavonóides extraídos de subprodutos da soja (BAJKACZ; ADAMEK, 2017), ácidos fenólicos a partir da sálvia, terpenóides de folhas de *Artemisia annua* (CAO et al., 2017), compostos fenólicos extraídos de diversas matrizes como óleo de oliva (GARCÍA et al., 2016), casca de uva (CVJETKO BUBALO et al., 2016; EL KANTAR et al., 2019; RADOŠEVIĆ et al., 2016), óleo de palma (ABDUL HADI et al., 2015) e *Mentha piperita* L. (JEONG et al., 2018) são cada vez mais estudados devido ao potencial do extrato de aplicação em alimentos. Em relação a matriz escolhida para este trabalho não foram

encontradas pesquisas relacionando o uso dos DES durante a extração de biomoléculas provenientes da *E. pyriformis* C.

#### 2.4. ESTADO DA ARTE

Com relação as folhas de uvaia, existem poucos estudos disponíveis na literatura. Apel e colaboradores (2004), utilizaram folhas frescas de uvaia para a obtenção de óleo essencial. Em seguida realizaram uma caracterização da composição química. Klein e colaboradores (2018) verificaram o efeito das técnicas de ultrassom assistida e CO<sub>2</sub> supercrítico durante a obtenção de extratos ricos em  $\alpha/\beta$ -amirina. Salvador e colaboradores (2011) verificaram a capacidade antioxidante e o teor de compostos fenólicos em folhas de diferentes plantas pertencente à família das Myrtaceae, incluindo a uvaia.

Com base no estado da arte, optou-se pelo emprego de um método convencional, utilizando célula encamisada com controle de temperatura e agitação (ESL em batelada) e também a UAE, afim de verificar o potencial das técnicas e eficiência de extração dos compostos bioativos presentes nas folhas de *E. pyriformis* C. Sobre o potencial antimicrobiano dos extratos de folhas de uvaia, De Souza e colaboradores (2014) realizaram um estudo em que o potencial de extratos de uvaia obtidos foi avaliado. Foram empregados nesse trabalho solventes hidroalcoólicos, acetona e extrato bruto, além das frações obtidas por meio do hexano, clorofórmio e acetato de etila. Como resultado, os autores verificaram potencial de inibição de crescimento de bactérias e fungos devido à presença de esteróis, triterpenos, taninos e também compostos fenólicos. Além dos compostos citados, Chavasco e colaboradores (2014) também encontraram saponinas e flavonoides a partir de extratos etanólicos, verificando potencial antimicrobiano.

A busca por diversos solventes possibilita a sua aplicação de acordo com a biomolécula de interesse. Até o presente momento, não foram encontrados estudos disponíveis na literatura em que HBD e o ChCl (HBA) foram avaliados separadamente em soluções aquosas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais e métodos utilizados durante o desenvolvimento deste trabalho, o qual foi realizado no Laboratório de Termodinâmica e Operações de Separação (LATOS) do Departamento de Engenharia Química (DEQMATERIAL).

#### 3.1. MATERIAL

A TABELA 1 descreve os reagentes utilizados durante as etapas de preparação da amostra, extração e nas análises de avaliação do potencial do extrato (capacidade antioxidante, compostos fenólicos totais e atividade antimicrobiana). Com relação a síntese dos DES, os reagentes podem ser observados na TABELA 2. Todos os reagentes utilizados apresentam alto grau de pureza. Na TABELA 3 estão descritas as cepas de bactéria utilizadas na análise de atividade antimicrobiana.

TABELA 1 – LISTA DE REAGENTES

(continua)

Reagente	Massa Molar (g·mol <sup>-1</sup> )	Nº do CAS	Pureza	Marca
ABTS	548,68	30931-67-0	98,0%	Sigma-Aldrich
Acetato de Sódio	82,03	127-09-3	≥99,0%	Dinâmica
Acetona	58,08		99,7%	JT Baker
Ácido Acético Glacial	60,05	64-19-7	99,8%	Neon
Ácido Clorídrico	36,46	7647-01-0	37%	Anidrol
Ágar Muller Hinton	-			Kasvi©
Carbonato de Sódio	105,99	497-19-8	99%	Nuclear
Cloranfenicol	-			Laborclin©
Cloreto Férrico	162,20	7705-08-0	97,0%	Sigma-Aldrich
Cloreto de Sódio	58,44	7647-14-5	≥99,0%	Êxodo Científica
DPPH	394,32	1898-66-4	-	Sigma-Aldrich
Etanol	46,07	64-17-5	≥99,5%	CRQ
Fosfato de Sódio Monobásico	119,98	7558-80-7	≥98,0%	Neon
Hidróxido de Sódio	40,00	1310-72-2	≥99,0%	Merck
Solução padrão McFarland	-	-	-	BioMérieux©

TABELA 1 – LISTA DE REAGENTES

Reagente	Massa Molar (g·mol <sup>-1</sup> )	N° do CAS	Pureza	Marca
Quercetina	338,27	6151-25-3	≥99,0%	Sigma-Aldrich
Reagente Folin Ciocalteau	-	-	-	Sigma-Aldrich
TPTZ	312,33	2682-35-7	≥98,0%	Sigma-Aldrich
Trolox	250,29	53188-07-1	97%	Sigma-Aldrich

FONTE: A autora (2020).

TABELA 2 – LISTA DE REAGENTES UTILIZADOS DURANTE O PREPARO DOS DES

(continua)

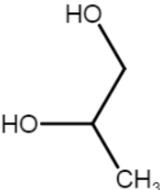
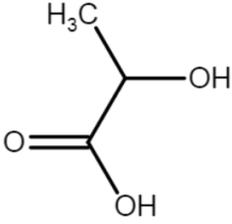
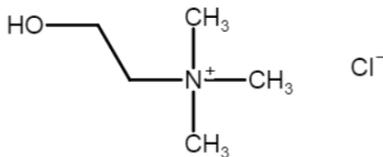
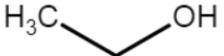
Reagente	Fórmula Molecular	Massa Molar (g·mol <sup>-1</sup> )	N° do CAS	Pureza	Marca
1,2 – Propanodiol		76,09	57-55-6	≥99,5%	Sigma-Aldrich
Ácido Láctico		90,08	50-21-5	85%	Sigma-Aldrich
Cloreto de Colina		139,62	67-48-1	≥98,0%	Inlab
Etanol		46,07	64-17-5	≥99,5%	CRQ

TABELA 2 – LISTA DE REAGENTES UTILIZADOS DURANTE O PREPARO DOS DES

(continua)

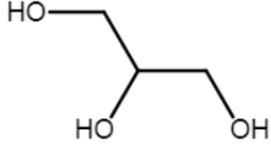
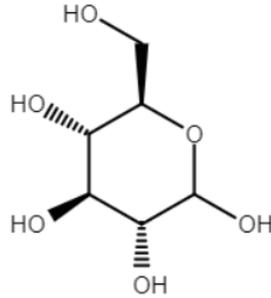
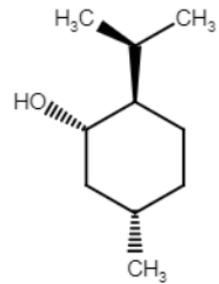
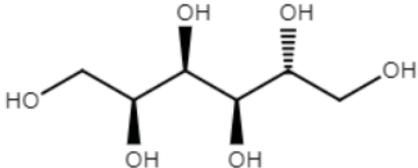
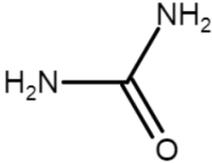
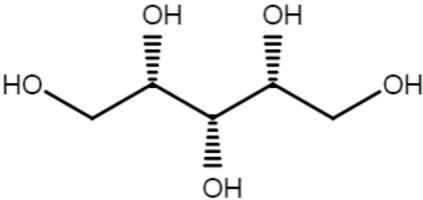
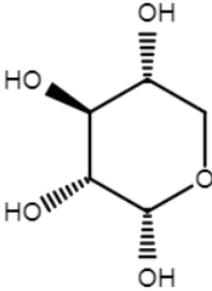
Reagente	Fórmula Molecular	Massa Molar (g·mol <sup>-1</sup> )	N° do CAS	Pureza	Marca
Glicerol		92,09	56-81-5	≥99.5%	Merk Millipore
Glucose		180,16	50-99-7	≥99.5%	Sigma-Aldrich
Mentol		156,27	89-78-1	≥95%	Sigma-Aldrich
Sorbitol		157,17	50-70-4	≥98,0%	Sigma-Aldrich

TABELA 2 – LISTA DE REAGENTES UTILIZADOS DURANTE O PREPARO DOS DES

Reagente	Fórmula Molecular	Massa Molar (g·mol <sup>-1</sup> )	N° do CAS	Pureza	Marca
Ureia		60,06	57-13-6	≥99,0%	Panreac
Xilitol		152,15	87-90-9	≥99,0%	Inlab
Xilose		150,03	58-86-6	≥99,0%	Dinâmica

FONTE: A autora (2020).

TABELA 3 – LISTA DE BACTÉRIAS

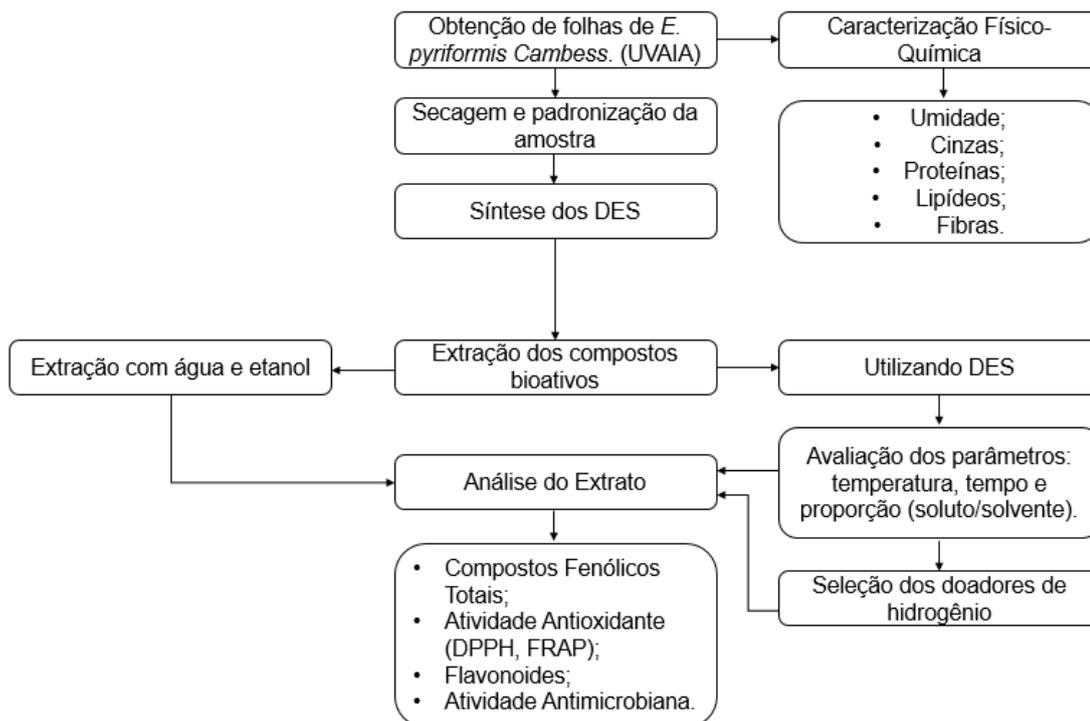
Bactérias	Marca
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC® 13124™
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922™
<i>Listeria Monocytogenes</i>	ATCC® 7644™
<i>Salmonella sp.</i>	ATCC® 13076™
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 25923™

FONTE: A autora (2020).

### 3.2. MÉTODOS

A FIGURA 4 exibe uma visão geral das principais etapas empregadas neste trabalho para que o objetivo proposto fosse atingido.

FIGURA 4 – FLUXOGRAMA GERAL DAS PRINCIPAIS ETAPAS EMPREGADAS DURANTE A OBTENÇÃO DO EXTRATO RICO EM COMPOSTOS FENÓLICOS



FONTE: A autora (2020).

#### 3.2.1. Preparo da amostra

Folhas de *E. pyriformis* C. foram coletadas de exemplares cultivados na Bio Estação Gaia, localizada no município de Piraquara, Paraná, Brasil (coordenadas geográficas S 25° 504' 987' e W 49° 008' 414''), cadastro SisGen (n° AA5E976), exsicata MBM218533. Após a coleta, as folhas foram secas em estufa com circulação de ar (FABBE) a 45°C por 24 horas.

Em seguida a amostras foram moídas em um moinho de facas (Requipal, MR 320) e peneiradas em malha de 20 *mesh*. O pó obtido (FIGURA 5) foi armazenado à vácuo em sacos de polietileno de baixa densidade (PEBD), sendo mantido ao abrigo

de luz até posterior análises afim de proteger o material contra possíveis reações de oxidação e ação de micro-organismos.

FIGURA 5 – AMOSTRA DE FOLHAS DE UVAIA EM PÓ SUBMETIDAS AO PROCESSO DE SECAGEM



FONTE: A autora (2020).

### 3.2.2. Caracterização Físico-Química

A determinação dos teores de umidade e cinzas foi realizada de acordo com a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). O método consiste na secagem direta da amostra em estufa à 105°C até peso constante, monitorada com o auxílio de uma balança analítica. Em seguida, a amostra foi colocada em forno tipo Mufla a 550°C durante aproximadamente duas horas. Os resultados de umidade e cinzas serão expressos em porcentagem.

A avaliação do teor de lipídeos foi realizada por extração direta em aparelho *Soxhlet* utilizando o solvente orgânico éter de petróleo. Para a análise de proteína bruta (PB) foi utilizado o processo de digestão Kjeldahl com o reagente ácido sulfúrico. O método consiste na decomposição da matéria orgânica transformando o nitrogênio (N) presente na amostra em amônia. O teor de PB foi determinado através da multiplicação do N total pelo fator de conversão (AOAC, 2005).

A determinação do teor de fibra alimentar total seguiu a metodologia de nº985.29 descrita pela AOAC (2005) que consiste em um método enzimático-gravimétrico. O teor de carboidratos foi definido por diferença.

### 3.2.3. Síntese e Seleção dos DES

Os DES utilizados foram sintetizados de acordo com a metodologia proposta por DAI e colaboradores (2013b). O método consiste em pesar o HBD e HBA em balança analítica (Mettler Toledo, modelo AL204) nas proporções previamente determinadas de acordo com estudos disponíveis na literatura (TABELA 5). Em seguida a mistura foi transferida para um banho-maria *Dubnoff* (Ethik Technology) a uma temperatura igual ou superior a 60 °C e constante agitação até a formação de um líquido homogêneo e transparente. O tempo de formação variou de 30 minutos a 24 horas, sendo os DES formados a partir de carboidratos os que demandaram um maior tempo de síntese. Em seguida os DES foram devidamente armazenados em estufa à 35 °C até posterior utilização.

Na TABELA 4 estão descritos os HBDs avaliados, a razão molar e referência utilizada. Em todos os DES formados o ChCl foi utilizado como HBA. Foram testados HBDs de hidrofobicidade diferente, de acordo com o Log  $K_{(ow)}$ .

TABELA 4 – HBDs LOG  $K_{(ow)}$  E RAZÃO MOLAR UTILIZADAS DURANTE A SÍNTESE DOS DES

HBD	Abreviação	Log $K_{(ow)}$	Razão Molar
1,2 – Propanodiol	CCP	-1.04	1:2
Ácido Lático	CCLA	-0.72	1:2
Glucose	CCG	-3.00	2:1
Glicerol	CCGY	-1.76	1:2
Etanol	CCE	-0.31	1:2
Sorbitol	CCS	-2.20	2:1
Ureia	CCU	-2.11	2:1
Xilitol	CCX	-2.56	2:1
Xilose	CCXY	-1.98	2:1

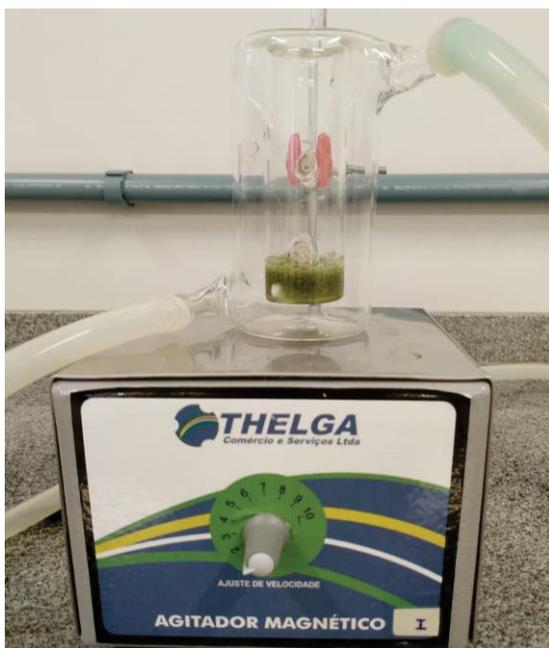
FONTE: DAI e colaboradores (2013); YADAV e colaboradores (2014); PubChem (2016).

### 3.2.4. Extração dos compostos fenólicos

O processo de extração foi executado em célula encamisada com constante agitação e controle de temperatura (Lab. Companion RW-1025G). As amostras de *E. pyriformis* C. e os respectivos solventes foram pesados em balança analítica (Mettler Toledo, modelo AL204) e em seguida foram submetidos ao processo de extração (FIGURA 6). Posteriormente, os extratos obtidos foram centrifugados a 3500 rpm por

30 minutos (Thermo Scientific – Heraeus fresco 21) até completa separação dos sólidos. O sobrenadante foi coletado e armazenados sob refrigeração, mantidos ao abrigo da luz por no máximo 24 horas após a coleta.

FIGURA 6 – PROCESSO DE EXTRAÇÃO CONVENCIONAL COM CONTROLE DE TEMPERATURA E CONSTANTE AGITAÇÃO



FONTE: A autora (2020).

A ESL assistida por ultrassom foi empregada para efeitos de comparação, por meio de um banho de ultrassom (FISCHER SCIENTIFIC FS20D), conforme FIGURA 7. O procedimento foi o mesmo realizado na ESL em célula encamisada com relação as etapas de preparo da amostra (pesagem), centrifugação e coleta do sobrenadante. As amostras foram submetidas a potência de 40 kHz, variação de temperatura entre 25 °C a 65 °C e tempos de extração equivalente a 30 a 240 minutos.

FIGURA 7 – EQUIPAMENTO DE ULTRASSOM UTILIZADO DURANTE A EXTRAÇÃO



Fonte: A autora (2020).

A eficiência do processo de obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos está interligada com a potencialização dos parâmetros de tempo, temperatura, técnica de extração, solvente e razão solvente: soluto. Para todas as análises descritas a seguir, foram também avaliados o potencial dos solventes puros, de forma que o valor encontrado foi considerado como o branco e descontado para que o resultado obtido representasse somente o extrato em questão.

Inicialmente avaliou-se o potencial de extração baseados nas análises de compostos fenólicos totais (CFT), atividade antioxidante (DPPH) e flavonoides totais (FT). A extração empregando os DES (TABELA 4) foram realizadas nas temperaturas de 25, 45 e 65 °C, fixando o tempo de extração em 120 minutos. Após a seleção dos solventes que apresentaram melhores desempenho, foram avaliados o efeito da temperatura e do tempo na eficiência do processo de extração. Os extratos foram submetidos à extração em intervalos de 30 minutos até o tempo final de 240 minutos. O mesmo procedimento foi realizado para a ESL assistida por ultrassom.

Após a determinação das melhores condições extração com relação ao binômio tempo:temperatura, foi avaliada o efeito da razão massa de sólido: volume de solvente ( $m \cdot v^{-1}$ ) (1:10, 1:20 e 1:30). Nessa etapa, os três melhores solventes selecionados e os extratos obtidos foram analisados com relação aos compostos fenólicos totais, atividade antioxidante (DPPH e FRAP), flavonoides e atividade antimicrobiana. Essas metodologias são apresentadas nas seções seguintes.

Por fim, além dos DES também foram realizadas ESL utilizando como solventes HBDs que apresentaram melhores desempenhos nas etapas anteriores ácido láctico (LA), 1,2-propanodiol (PROP) e glicerol (GLY), além de solução aquosa

de ChCl 50% ( $m \cdot v^{-1}$ ) (CC). Nesta etapa também foi realizada uma ESL a partir de um DES hidrofóbico formado a partir de mentol e ácido láctico (MLA) na proporção 1:2 afim de verificar o potencial de extração de bioativos como os flavonoides. O objetivo dessa etapa foi avaliar se os desempenhos observados anteriormente se devem ao efeito combinado de doador e receptor de hidrogênio (DES) ou ao efeito individual desses componentes. Foram também avaliadas a ESL empregando solventes convencionais (água e etanol) a fim de permitir a comparação.

### 3.2.5. Análises do potencial dos extratos

Os extratos obtidos foram avaliados quanto ao CFT empregando a metodologia proposta por Singleton e Rossi (1965) modificada por Bakirtzi; Triantafyllidou e Makris (2016) utilizando o reagente Folin Ciocalteu. A curva de calibração é preparada com ácido gálico com variação das concentrações de 0,1 a 0,8  $mg \cdot mL^{-1}$ .

O método consiste em adicionar em tubos 1,68 mL de água, 20  $\mu L$  de extrato de *E. pyrifomis C.* diluído em água (1:10  $v \cdot v^{-1}$ ) e 100  $\mu L$  de reagente Folin Ciocalteu. Em seguida a amostra é deixada em repouso por 3 minutos. Após o repouso, adiciona-se 200  $\mu L$  de carbonato de sódio. Posteriormente, a amostra é agitada em vórtex e mantida sob repouso ao abrigo de luz por 1 hora. O branco foi preparado através de uma mistura nas mesmas quantidades empregadas de água, reagente Folin Ciocalteu e carbonato de sódio. Após a incubação, as amostras foram avaliadas em espectrofotômetro de UV-Vis (Shimadzu UV-1700) em comprimento de onda de 760 nm. Os resultados são expressos em mg de ácido gálico por g da amostra ( $mgAG \cdot g^{-1}$ ).

A atividade antioxidante dos extratos foi mensurada empregando os métodos DPPH e FRAP. No método DPPH (2,2-Difenil-1-picril-hidrazil) a atividade antioxidante é determinada a partir da capacidade da amostra de sequestrar o radical DPPH, conforme proposto por Brand-Williams; Cuvelier e Berset (1995). A estabilização do radical livre DPPH através da ação do antioxidante promove mudança de coloração da amostra de violeta escuro para violeta claro indicando a atividade antioxidante do composto.

A solução DPPH é preparada a partir de 3,95 mg de DPPH, 50 mL de etanol e 50 mL de tampão fosfato de sódio monobásico (50mM, pH 6,0). O método consiste

em adicionar em tubos 1,95 mL de solução DPPH e 50  $\mu\text{L}$  de extrato de *E. pyriformis* C. diluído em água (1:10 v·v<sup>-1</sup>). Em seguida, a amostra é agitada em vórtex e incubada por 30 minutos ao abrigo de luz. Após a incubação, as amostras foram submetidas a análise de espectrofotômetro de UV-Vis (Shimadzu UV-1700) em um comprimento de onda de 517 nm. A curva padrão de calibração é construída a partir da variação de concentração da solução padrão trolox entre 0,03 a 1,60 mmol·mL<sup>-1</sup>. Os resultados foram expressos em mmol de trolox por g da amostra.

O método FRAP (do inglês “*Ferric Reducing Antioxidant Power*”), proposto por Benzie e Strain (1996) e modificado por RUFINO e colaboradores (2006), consiste na redução do Fe (III) a Fe (II). A solução FRAP constitui-se de uma mistura de acetato de 300mM de solução pH 3,6 e 10 mM 2, 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), 40 mM de HCl e 20 mM de solução de cloreto férrico. Consiste em adicionar em tubos 45  $\mu\text{L}$  de extrato diluído em água (1:10 v·v<sup>-1</sup>), 135  $\mu\text{L}$  de água e 1,35 mL do reagente FRAP. Em seguida a amostra é agitada em vórtex e mantida sob abrigo de luz durante 30 minutos. As amostras submetidas a análise em espectrofotômetro de UV-Vis (Shimadzu UV-1700) em um comprimento de onda de 595 nm. A curva de calibração é determinada a partir de soluções de trolox (0,1 a 0,9 mmol·mL<sup>-1</sup>). Os resultados foram expressos em mmol de trolox por g de amostra.

Os extratos obtidos foram também avaliados quanto ao teor de flavonoides totais conforme metodologia proposta por Prommuak; De-Eknamkul; Shotipruk (2008). A metodologia consiste em adicionar em tubos de 250  $\mu\text{L}$  de extrato diluído em água (1:10 v·v<sup>-1</sup>), 750  $\mu\text{L}$  de etanol, 50  $\mu\text{L}$  de solução de cloreto de alumínio 10% (m·v<sup>-1</sup>), 50  $\mu\text{L}$  de acetato de potássio (1mol·L<sup>-1</sup>) e 1,4 mL de água. Em seguida a amostra é agitada em vórtex e mantida sob abrigo de luz durante 30 minutos. Por fim, as amostras foram submetidas a análise em espectrofotômetro de UV-Vis (Shimadzu UV-1700) em um comprimento de onda de 415 nm. A curva de calibração é construída utilizando quercetina como solução padrão (5 a 100  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e os resultados expressos em mg de quercetina por g de amostra.

A atividade antimicrobiana do extrato é avaliada por meio da técnica de disco de difusão conforme metodologia proposta por *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2007). Neste trabalho, foi verificado o potencial do extrato de *E. pyriformis* C. contra as bactérias: *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Listeria Monocytogenes*, *Salmonella sp.* e *Staphylococcus aureus*. A reativação das bactérias é realizada em caldo Mueller Hinton seguida de plaqueamento em ágar Mueller Hinton.

Os extratos testados são transferidos para solução salina (0,85%) até que a concentração de  $10^8$  UFC·mL<sup>-1</sup> seja alcançada.

O método consiste em adicionar 20 µL do extrato diluído em discos brancos estéreis e depositar sobre as placas contendo 25 mL de ágar Mueller Hinton e os micro-organismos inoculados ( $10^8$  UFC·mL<sup>-1</sup>). Para o controle positivo é adicionado 30 µg de Chloramphenicol em discos brancos estéreis sobre as placas. Para o controle negativo, foram incorporados os solventes puros utilizados durante a extração (ácido láctico, 1,2-propanodiol e glicerol).

Após a inoculação dos extratos e controles positivos e negativos, as placas são incubadas invertidas em estufa 37 °C por 24 h. A determinação do potencial do extrato quanto a atividade antimicrobiana foi verificada por meio dos halos inibitórios utilizando paquímetro digital.

### 3.2.6. Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância ANOVA unidirecional seguido pelo teste de Tukey, considerando  $p < 0,05$  significativo a nível de comparação. Todos os resultados foram apresentados utilizando a média de três replicadas independentes  $\pm$  desvio padrão (DP). As análises estatísticas foram realizadas através do *Software Statistica* (Versão 10.0, StatSoft).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são abordados os resultados obtidos através da extração de compostos fenólicos proveniente de folhas de uvaia utilizando os DES. Inicialmente, a fim de determinar a composição da matéria-prima, realizou-se uma caracterização físico-química das folhas desidratadas. Em seguida, foram selecionados os DES e realizada a otimização do processo de extração por meio da avaliação dos parâmetros de tempo, temperatura, proporção entre solvente e amostra. Por fim, comparou-se a eficiência de extração dos DES com relação a diversos solventes, previamente selecionados. Todas as análises empregadas foram realizadas em triplicata.

Após a determinação dos melhores parâmetros de extração e dos melhores DES com relação a presença de biocompostos de interesse, as amostras foram submetidas a análise de atividade antimicrobiana.

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

A composição físico-química das folhas de uvaia em pó pode ser observada na TABELA 5. Os resultados foram expressos em base seca e o teor de carboidratos foi determinado por diferença. Cerca de metade da composição corresponde a fibra alimentar (49,22%), seguido de proteínas (16,25%) e cinzas (8,88). A fibra alimentar é obtida a partir de matrizes vegetais, sendo dividida em fibra dietética solúvel (pectina, gomas e mucilagens) e insolúvel (celulose, hemicelulose e lignina) em água (DHINGRA et al., 2012; XUE et al., 2019).

TABELA 5 – COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FOLHAS DE UVAIA EM PÓ

<b>Parâmetros analisados (%)</b>	<b>Folhas de Uvaia (b.s)</b>
Umidade	8,88 ± 0,57
Cinzas	11,45 ± 0,16
Lipídeos	4,11 ± 0,21
Proteínas	16,25 ± 0,06
Fibra Alimentar	49,22 ± 3,04
Carboidratos	10,09

FONTE: A autora (2020).

Os benefícios como redução de colesterol total, risco de doenças cardíacas, regulação da pressão arterial, alívio de constipação e regulamento do pH intestinal são alguns dos benefícios interligados a ingestão das fibras alimentares (DHINGRA et al., 2012). Os altos teores encontrados nas folhas aumentam seu potencial de exploração, devido a aplicabilidade das fibras em diversos produtos alimentares.

As proteínas são essenciais para o corpo humano e exibem inúmeras atividades biológicas de elevada importância. Em alimentos, as proteínas são responsáveis por conferir propriedades sensoriais como textura, aparência, cor e sabor. Quando interagem com outros alimentos como lipídeos e açúcares por exemplo, modificam e valorizam suas propriedades funcionais (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008).

Estudos disponíveis indicam que vegetais como abóbora podem ser considerados de alto teor proteico (11,75%) (GHALY; ALKOAİK, 2010), valor similar ao encontrado neste estudo correspondente a 16,26%. Contudo, é importante destacar que a biodisponibilidade das proteínas deve ser investigada, considerando que as proteínas de origem vegetal são menos digeridas pelo organismo humano do que as proteínas de origem animal (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008).

O teor de umidade é um fator de elevada importância em vegetais desidratados e em pó. Além disso, é uma análise crucial pois pode afetar na qualidade do produto principalmente pelas alterações nutricionais e microbiológicas, ocasionando em proliferação de bactérias responsáveis por degradar o alimento (BURTON; ENGELKIRK, 2003).

Não foram encontrados na literatura dados relacionados a composição centesimal das folhas de uvaia em pó. Os estudos disponíveis estão concentrados na caracterização de seus frutos (GUSTAVO SGANZERLA et al., 2018; PEREIRA et al., 2012). Com relação as outras espécies como a pitanga (*Eugenia uniflora L.*), mesmo sendo amplamente disseminada, ainda há escassez de análises relacionadas as suas folhas.

## 4.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO

### 4.2.1. Seleção dos DES

A seleção dos solventes com maior capacidade de extração foi realizada a partir das análises de CFT e atividade antioxidante (DPPH) com base na variação de temperatura (25 °C, 45 °C e 65 °C) mantendo constante o tempo de 120 minutos e a proporção ( $m \cdot v^{-1}$ ) de 1:20. Os resultados estão descritos na TABELA 6

TABELA 6 – CONTEÚDO CFT E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH) DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE UVAIA OBTIDOS A PARTIR DOS DES, TENDO COMO BASE A INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO

Solvente	25 °C			45 °C			65 °C		
	CFT(mg·g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	DPPH (mmol·g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	CFT (mg·g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	DPPH (mmol·g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	CFT (mg·g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	DPPH (mmol·g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	CFT (mg·g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	DPPH (mmol·g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	
CCP	43,31 <sup>a,b,c,d</sup> ±5,03	0,14 <sup>b,e</sup> ±0,00	71,04 <sup>c</sup> ±1,17	0,15±0,00	91,04 <sup>a,b,e</sup> ±4,21	0,29±0,00			
<b>CCLA</b>	<b>80,50<sup>e</sup>±6,70</b>	<b>0,19<sup>f</sup>±0,00</b>	<b>92,63<sup>b</sup>±0,09</b>	<b>0,19<sup>e</sup>±0,00</b>	<b>142,37<sup>f</sup>±2,66</b>	<b>0,38<sup>g</sup>±0,00</b>			
CCG	16,43 <sup>a</sup> ±0,05	0,16 <sup>a,b,c</sup> ±0,00	45,06 <sup>d</sup> ±2,65	0,18 <sup>b</sup> ±0,00	115,17 <sup>b,c,d,f</sup> ±3,11	0,33 <sup>b</sup> ±0,00			
CCGY	72,35 <sup>e</sup> ±4,14	0,16 <sup>a,c,d</sup> ±0,00	69,45 <sup>c,f</sup> ±1,14	0,17 <sup>a,e</sup> ±0,00	128,57 <sup>d,f</sup> ±0,38	0,32 <sup>a,e</sup> ±0,00			
CCE	61,82 <sup>d,e</sup> ±1,48	0,14 <sup>e</sup> ±0,00	83,53 <sup>a,b</sup> ±0,76	0,14 <sup>f</sup> ±0,00	112,43 <sup>a,b,c,d</sup> ±0,71	0,27±0,00			
CCS	28,14 <sup>a,b</sup> ±1,44	0,17 <sup>c,d</sup> ±0,00	54,50 <sup>d,e</sup> ±1,50	0,18 <sup>a,b</sup> ±0,00	76,90 <sup>e</sup> ±4,52	0,32 <sup>a,b</sup> ±0,00			
CCU	54,01 <sup>b,c,d,e</sup> ±2,82	0,15 <sup>a,b,e</sup> ±0,00	84,05 <sup>a,b</sup> ±0,64	0,17 <sup>d</sup> ±0,00	99,51 <sup>a,b,c,e</sup> ±3,81	0,30 <sup>d</sup> ±0,00			
CCX	43,04 <sup>a,b,c</sup> ±0,09	0,16 <sup>a,c,d</sup> ±0,00	59,37 <sup>a,c</sup> ±2,20	0,17 <sup>e</sup> ±0,00	86,15 <sup>a,b,c,d</sup> ±0,86	0,32 <sup>e</sup> ±0,00			
CCXY	39,31 <sup>a,b,c,d</sup> ±2,88	0,17 <sup>d</sup> ±0,00	74,53 <sup>e,f</sup> ±1,35	0,18 <sup>a,b</sup> ±0,00	108,58 <sup>a,e</sup> ±0,47	0,32 <sup>a,b</sup> ±0,00			

FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: <sup>a</sup> CFT (mg de ácido gálico·g de amostra<sup>-1</sup>)

<sup>b</sup> DPPH (mmol de trolox·g de amostra<sup>-1</sup>)

<sup>c</sup> Valores obtidos por meio de ANOVA one-way. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre as amostras por meio do teste de Tukey com p≤0,05.

A partir dos DES testados, quatro foram selecionados de acordo com os melhores resultados obtidos por meio da variação da temperatura (CCLA, CCG, CCGY e CCP) para a avaliação da influência do tempo. A extração conduzida à 65 °C apresentou melhores resultados para todos os DES testados, concluindo que o aumento da temperatura interfere positivamente no processo de extração. ZHOU e colaboradores (2018), observaram que o aumento de 10 °C durante a extração de compostos fenólicos empregando os DES pode dobrar seu conteúdo em extratos provenientes de folhas de *Morus alba L.* (Hsieh e colaboradores (2020) também constataram um aumento significativo de compostos bioativos durante a extração de gengibre utilizando os DES. Os resultados indicam que a temperatura ótima corresponde a 50 °C e temperaturas superiores são responsáveis por degradar a biomolécula de interesse, diminuindo o rendimento de extração.

O solvente CCG exibiu maiores variações de concentração entre 16,43 mg de ácido gálico·g amostra<sup>-1</sup> a 25°C a 115,17 mg de ácido gálico·g de amostra<sup>-1</sup> a 65°C. A maioria dos DES apresenta alta viscosidade a temperatura ambiente, o que dificulta o processo de transferência de massa (ZHANG et al., 2012). A adição de água representa uma alternativa capaz de alterar esta propriedade (SAVI et al., 2019), contudo sua aplicação pode ocasionar em modificação das propriedades físico-químicas do DES devido ao enfraquecimento das ligações entre acceptor e doador de hidrogênio (HAMMOND; BOWRON; EDLER, 2017).

O aumento da temperatura de extração também é capaz de diminuir a viscosidade do DES, como observado em estudos como por ZHANG et al., (2012). Um aumento de 20 °C possibilitou um aumento equivalente a 50 mg de ácido gálico·g de amostra<sup>-1</sup> para o solvente CCLA, representando cerca de 1/3 do conteúdo encontrado na temperatura de 65 °C. Outro parâmetro que está interligado com a eficiência de extração e a viscosidade é a solubilidade dos compostos bioativos nos DES, que devido a ação da temperatura, é responsável por promover um aumento significativo no conteúdo dos compostos de interesse. A solubilidade descreve a contribuição polar e a dispersão das interações entre as ligações de hidrogênios que favorecem o processo de transferência de massa (HANSEN, 2007). Este fator revela a importância da temperatura na obtenção de extratos ricos em compostos bioativos.

O conteúdo de CFT à 65°C variou de 76,90 a 142,37 mg de ácido gálico·g de amostra<sup>-1</sup> para CCS e CCLA, respectivamente. Com relação a atividade antioxidante (DPPH) houve uma variação entre 0,27 a 0,38 mmol trolox·g de amostra<sup>-1</sup> para CCET

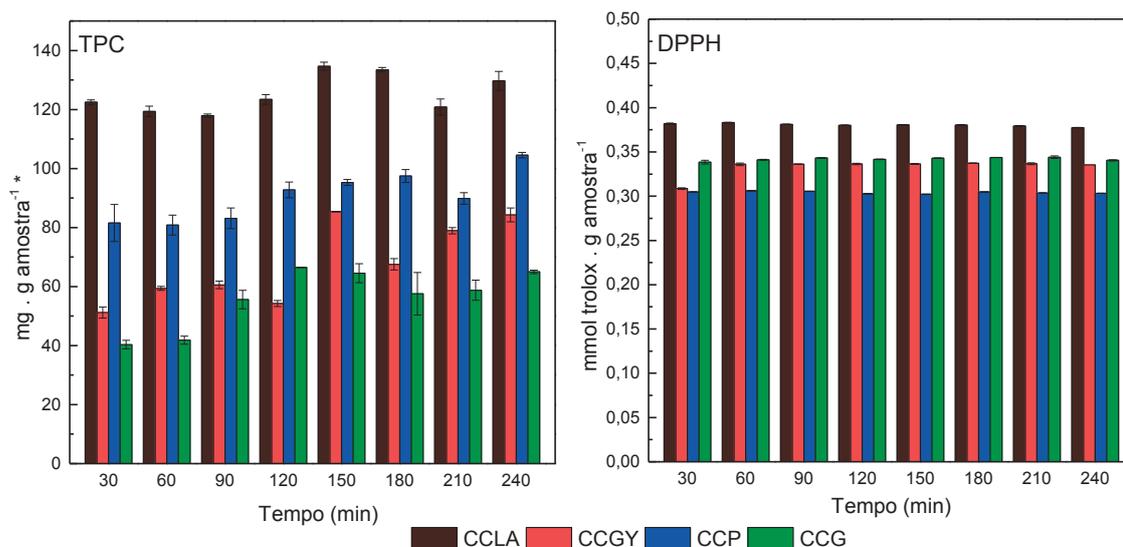
e CCLA, respectivamente. Ambas as análises demonstram que o CCLA exibe maior potencial de extração. Os DES a base de ácidos apresentam alta biocompatibilidade com os compostos fenólicos, devido a afinidade entre as ligações de hidrogênio proveniente dos DES e as biomoléculas de interesse (DAI; VERPOORTE; CHOI, 2014).

Os valores obtidos de DPPH foram muito próximos neste estudo, indicando que a atividade antioxidante foi mantida mesmo com o aumento da temperatura. Para a escolha dos melhores solventes, foram analisados os parâmetros de eficiência, diferença estatística e caráter do solvente, sendo selecionado um DES constituído de ácido (CCLA), dois a base de álcool (CCP e CCGY) e um composto de açúcar (CCG).

#### 4.2.2. Avaliação do tempo e proporção ( $m \cdot v^{-1}$ )

Em razão dos resultados apresentados na seção anterior, a temperatura foi fixada em 65 °C nesta etapa e a razão ( $m \cdot v^{-1}$ ) 1:20, a qual variou-se o tempo de extração  $t_{\text{inicial}} = 30$  minutos e  $t_{\text{final}} = 240$  minutos. As análises de CFT e DPPH indicaram que o CCLA apresenta maior eficiência de extração para todas as variações de tempo testadas (FIGURA 8).

FIGURA 8 – RELAÇÃO ENTRE VARIAÇÃO DE TEMPO E CONCENTRAÇÃO DE CFT E DPPH DOS EXTRATOS OBTIDOS DA UVAIA À 65 °C E 1:30 (M·V<sup>-1</sup>)<sup>1</sup>



FONTE: A autora (2020).

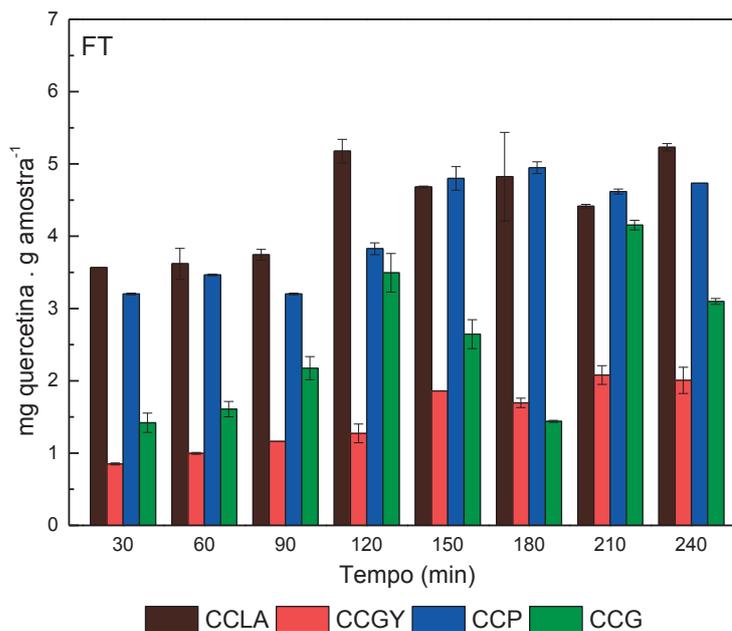
LEGENDA: \* CFT (mg de ácido gálico·g de amostra<sup>-1</sup>); DPPH (mmol de trolox·g de amostra<sup>-1</sup>).

O tempo ótimo de extração com relação ao CFT foi de 150 min para CCLA e CCGY. Para CCP e CCG houve pequenas variações entre 150 e 180 minutos de extração. Com relação ao DPPH, os valores encontrados foram muito próximos, variando de 0,30 mmol de trolox·g de amostra<sup>-1</sup> para CCP a 0,38 mmol de trolox·g de amostra<sup>-1</sup> para CCLA.

A respeito da análise de flavonoides totais (FT), foi observado baixas concentrações nos extratos analisados (FIGURA 9). Entre 150 e 180 minutos foram encontrados os maiores valores de FT para CCP, porém a diferença não foi considerável com relação ao CCLA. O conteúdo de flavonoides variou entre 1,43 e 5,17 mg de quercetina·g de amostra<sup>-1</sup> para os extratos obtidos a partir de CCG e CCLA respectivamente.

<sup>1</sup> CCLA: Cloreto de Colina: Ácido Lático; CCGY: Cloreto de Colina: Glicerol; CCP: Cloreto de Colina: 1,2 – Propanodiol; CCG: Cloreto de Colina: Glucose.

FIGURA 9 – RELAÇÃO ENTRE VARIAÇÃO DE TEMPO E CONCENTRAÇÃO DE FT DOS EXTRATOS OBTIDOS DA UVAIA<sup>2</sup>



FONTE: A autora (2020).

Com relação as baixas concentrações encontradas, essas podem estar relacionadas com a hidrofobicidade dos compostos de interesse. Os flavonoides como a quercetina são insolúveis em água e solúveis em solventes como o ácido acético, metanol e álcool (BENNETT, 1989; DAVID R LIDE, 2003). Os DES formados a partir de ChCl apresentam melhor afinidade de extração de compostos hidrofílicos, sendo considerados de menor eficiência durante a obtenção de bioativos como flavonoides se comparado aos DES de caráter mais hidrofóbico (SHAFIE; YUSOF; GAN, 2019).

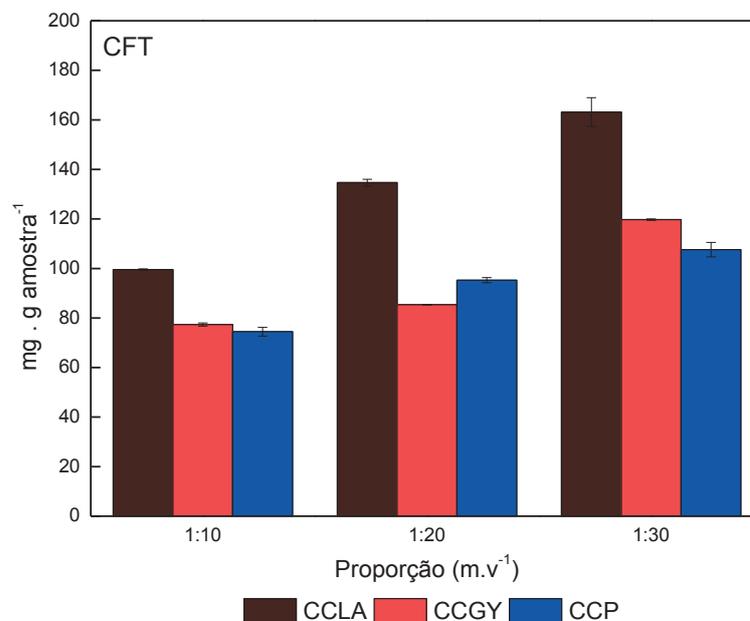
A partir do estudo da variação do tempo, foi escolhido trabalhar com três dos quatro solventes previamente selecionados. Como o foco deste estudo é a extração de compostos fenólicos de folhas de uvaia, o solvente CCG foi descartado, considerando que o mesmo apresentou resultados inferiores com relação aos outros solventes nas melhores condições de extração.

A partir dos resultados obtidos anteriormente, foi determinada a condição de trabalho para as etapas de seguintes, fixando a temperatura (65 °C) e o tempo (240 minutos). A etapa seguinte buscou avaliar a influência da proporção entre amostra e solvente testando as razões ( $m \cdot v^{-1}$ ) de 1:10, 1:20 e 1:30 com base nas análises de CFT, DPPH e CF.

<sup>2</sup> CCLA: Cloreto de Colina: Ácido Lático; CCGY: Cloreto de Colina: Glicerol; CCP: Cloreto de Colina: 1,2 – Propanodiol; CCG: Cloreto de Colina: Glucose.

Com relação ao CFT (FIGURA 10) os valores variaram de 99,53 a 163,15 mg de ácido gálico·g amostra<sup>-1</sup> para as razões 1:10 e 1:30, respectivamente. Para todos os solventes testados houve um aumento de CFT referente a diminuição da concentração de amostra.

FIGURA 10 – RELAÇÃO ENTRE VARIAÇÃO DE PROPORÇÃO (M·V<sup>-1</sup>) E CONCENTRAÇÃO DE CFT DOS EXTRATOS OBTIDOS DA UVAIA<sup>3</sup>



FONTE: A autora (2020).

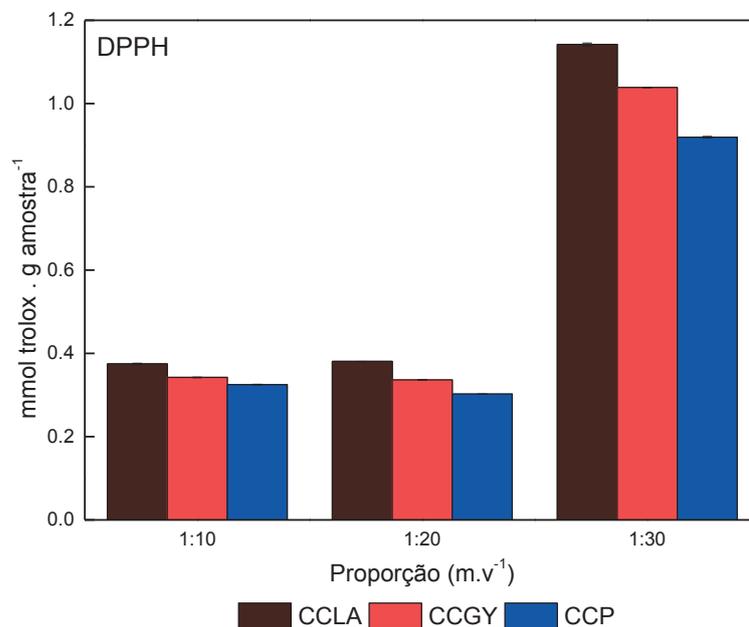
LEGENDA: CFT (mg de ácido gálico·g de amostra<sup>-1</sup>).

Com relação à análise de atividade antioxidante (FIGURA 11), a diferença foi ainda maior, variando de 0,30 a 1,14 mmol de trolox·g de amostra<sup>-1</sup> para as razões 1:20 (CCP) e 1:30 (CCLA), respectivamente. Acerca dos resultados encontrados foi verificado que a quantidade de amostra interfere na eficiência de extração, podendo ser correlacionada com a exposição da biomolécula de interesse ao solvente, influenciando a atividade antioxidante. O rendimento é afetado até que o equilíbrio entre soluto e solvente seja atingido, de forma que quantidades excessivas de amostra podem causar uma saturação do solvente, gerando efeitos indesejáveis como a

<sup>3</sup> CCLA: Cloreto de Colina: Ácido Lático; CCGY: Cloreto de Colina: Glicerol; CCP: Cloreto de Colina: 1,2 – Propanodiol.

redução da eficiência do processo de extração (OZTURK; PARKINSON; GONZALEZ-MIQUEL, 2018).

FIGURA 11 – RELAÇÃO ENTRE VARIÇÃO DE PROPORÇÃO ( $M \cdot V^{-1}$ ) E CONCENTRAÇÃO DE DPPH DOS EXTRATOS OBTIDOS DA UVAIA<sup>4</sup>

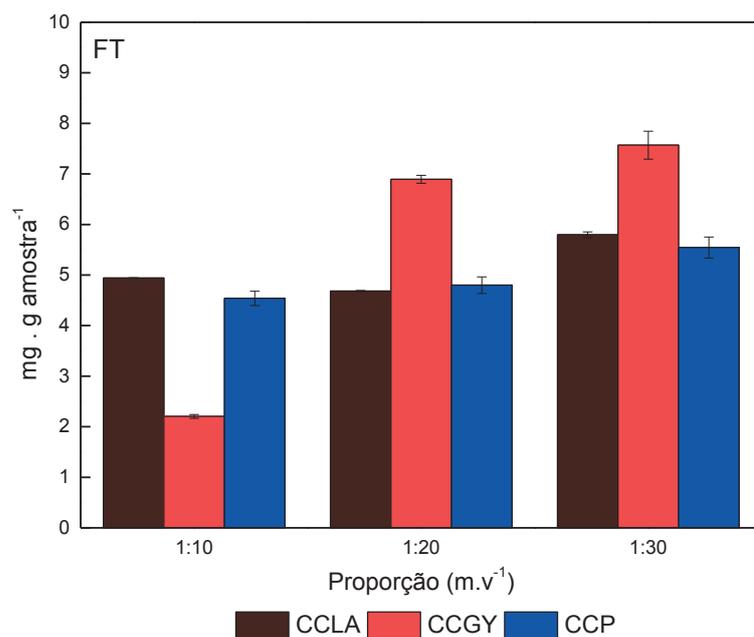


FONTE: A autora (2020).

A FIGURA 12 exibe os resultados obtidos para análise de FT. A extração conduzida com CCGY apresentou um aumento expressivo de concentração com relação as proporções 1:10 e 1:20. Observando que houve pequena diferença nas concentrações quando submetido a proporção de 1:30. Para esta análise a proporção exibiu menor influência na quantidade FT para os solventes CCLA e CCP.

<sup>4</sup> CCLA: Cloreto de Colina: Ácido Lático; CCGY: Cloreto de Colina: Glicerol; CCP: Cloreto de Colina: 1,2 – Propanodiol.

FIGURA 12 – RELAÇÃO ENTRE VARIAÇÃO DE PROPORÇÃO ( $M \cdot V^{-1}$ ) E CONCENTRAÇÃO DE FT DOS EXTRATOS OBTIDOS DA UVAIA<sup>5</sup>



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: FT ( $mg$  de quercetina  $\cdot g$  de amostra<sup>-1</sup>).

#### 4.2.3. Extração empregando etanol, água, HBDs e solução aquosa de HBA

De forma a permitir a avaliação comparativa da ESL utilizando DES, foram realizadas extrações empregando água e etanol, além dos HBDs (LA, PROP, GLY) e solução aquosa formada pelo HBA ChCl (CC). O rendimento dos extratos foi analisado quanto ao conteúdo de CFT, DPPH, FRAP e FT. Os resultados estão disponíveis na TABELA 7, assim como os dados referentes aos melhores DES testados. Os estudos foram desenvolvidos utilizando a técnica convencional (sem o emprego do ultrassom) e as condições estabelecidas nas etapas anteriores, temperatura ( $65 \text{ }^\circ\text{C}$ ), tempo (240 minutos) e proporção 1:30 ( $m \cdot v^{-1}$ ).

<sup>5</sup> CCLA: Cloreto de Colina: Ácido Lático; CCGY: Cloreto de Colina: Glicerol; CCP: Cloreto de Colina: 1,2 – Propanodiol.

TABELA 7 – TEOR DE CFT, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH E FRAP) E FT OBTIDOS A PARTIR DA EXTRAÇÃO DAS FOLHAS DE UVAIA UTILIZANDO OS DES, SOLVENTES CONVENCIONAIS E PUROS, SEM A PRESENÇA DO CLORETO DE COLINA

Solvente <sup>6</sup>	CFT(mg·g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	DPPH (mmol·g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	FRAP (mmol·g <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	FT (mg·g <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>
CCLA	163,15 <sup>e</sup> ±5,81	1,14 <sup>a</sup> ±0,00	1,02 <sup>d,e</sup> ±0,00	5,80 <sup>a,c</sup> ±0,06
LA	146,59 <sup>d</sup> ±4,11	0,43 <sup>b</sup> ±0,00	0,64 <sup>b</sup> ±0,03	10,82 <sup>d</sup> ±0,06
CCGY	119,72 <sup>c</sup> ±0,29	0,53 <sup>c</sup> ±0,00	0,62 <sup>d</sup> ±0,01	7,01 <sup>a,b</sup> ±0,67
GLY	120,99 <sup>c</sup> ±1,26	0,52 <sup>d</sup> ±0,00	1,08 <sup>d</sup> ±0,01	7,49 <sup>a,b</sup> ±0,29
CCP	107,61 <sup>c</sup> ±2,92	0,92 <sup>c</sup> ±0,02	0,89 <sup>e</sup> ±0,01	5,54 <sup>a,c</sup> ±0,21
PROP	79,29 <sup>b</sup> ±0,13	0,37 <sup>b</sup> ±0,00	0,67 <sup>b</sup> ±0,01	7,28 <sup>a,b</sup> ±0,02
CC <sub>aq</sub>	117,18 <sup>c</sup> ±4,52	0,45 <sup>c</sup> ±0,00	1,05 <sup>d</sup> ±0,03	7,18 <sup>a,b</sup> ±0,05
ET	40,76 <sup>a</sup> ±1,81	0,20 <sup>e</sup> ±0,01	0,51 <sup>a</sup> ±0,01	8,43 <sup>b</sup> ±0,08
WA	80,06 <sup>b</sup> ±5,84	0,37 <sup>b</sup> ±0,01	0,56 <sup>a,b</sup> ±0,01	4,46 <sup>c</sup> ±0,07

FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: <sup>a</sup> CFT (mg de ácido gálico·g de amostra<sup>-1</sup>)

<sup>b</sup> DPPH (mmol de trolox·g de amostra<sup>-1</sup>)

<sup>c</sup>FRAP (mmol de trolox·g de amostra<sup>-1</sup>)

<sup>d</sup>FT (mg de quercetina·g de amostra<sup>-1</sup>)

<sup>e</sup> Valores obtidos por meio de ANOVA *one-way*. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre as amostras por meio do teste de Tukey com  $p \leq 0,05$ .

A água e o etanol apresentaram baixa eficiência de extração comparada aos demais solventes testados, evidenciando o potencial de aplicação dos DES. De acordo com a literatura, os solventes orgânicos como o etanol apresentam baixa efetividade de extração, como verificado nesse estudo, além de limitada biocompatibilidade e ação de degradação dos compostos de interesse, justificando os valores baixos encontrados durante a extração conduzida com etanol (SAFDAR et al., 2017).

O DES cloreto de colina: ácido láctico (CCLA) apresentou os maiores valores de CFT e melhor atividade antioxidante por DPPH. O glicerol (GLY), apresentou atividade antioxidante (FRAP) superior aos demais solventes testados. Com relação ao teor de FT, o solvente LA apresentou maiores concentrações. Por meio da análise estática,

<sup>6</sup> CCLA: Cloreto de Colina: Ácido Láctico; LA: Ácido Láctico; CCGY: Cloreto de Colina: Glicerol; GLY: Glicerol; CCP: Cloreto de Colina: 1,2-Propanodiol; PROP: 1,2-Propanodiol; CC<sub>aq</sub>: Solução aquosa de Cloreto de Colina; ET: Etanol; WA: Água.

foi possível concluir que há diferença significativa entre os DES e os HBDs avaliados, CCLA e LA e.g. Neste estudo, também foi possível verificar que a solução aquosa de cloreto de colina é um solvente de elevada eficiência.

O ácido láctico apresenta miscibilidade com diversos compostos de caráter hidrofílico e hidrofóbico como água, etanol, ácidos orgânicos, glicerol, podendo ser utilizado durante a síntese de DES de diferentes polaridades. De acordo com o coeficiente de partição octanol-água  $\log K_{(ow)}$  com relação aos HBDs testados, a solução aquosa de ácido láctico apresenta maior hidrofobicidade, seguindo ordem decrescente LA<PROP<GLY, elucidando o fato de ter atuado com melhor solvente durante a extração de FT (PUBCHEM, 2016).

Devido ao conteúdo encontrado de FT a partir dos extratos de CCLA e LA, considerando a importância da hidrofobicidade na eficiência de extração, foi empregado um DES de caráter hidrofóbico sintetizado por meio da mistura entre mentol e ácido láctico de proporção molar 2:1 (MLA). Para esses sistemas as amostras foram submetidas às análises de CFT e FT afim de confrontar os dados obtidos anteriormente.

Os resultados obtidos indicaram que a extração de flavonoides por meio de MLA foi quase que três vezes maior (16,07 mg de quercetina·g de amostra<sup>-1</sup>) do que a concentração obtida através de CCLA (16,07 mg de quercetina·g de amostra<sup>-1</sup>). Entretanto, no tocante a análise de CFT o resultado obtido foi inferior a todos os DES anteriormente testados (50,67 mg de ácido gálico·g de amostra<sup>-1</sup>). A concentração foi superior apenas com relação ao emprego do etanol.

Os DES hidrofóbicos apresentam vantagens interligadas a baixa viscosidade e densidade inferior ao da água, que favorecem um processo em que não há necessidade do emprego de altas temperaturas. RIBEIRO e colaboradores (2015) verificaram o potencial de partição de biomoléculas a partir de DES hidrofóbicos. Com relação ao ácido ftálico, que apresenta baixa solubilidade em água, os autores observaram que os DES formados a partir de ácido láctico e ácido acético apresentam maiores coeficientes de partição.

YANG; TAN; GU (2012), utilizaram pela primeira vez o ácido láctico como solvente para reações orgânicas, incluindo a obtenção de compostos fenólicos. Os autores justificam o uso deste solvente correlacionando com a baixa toxicidade, alta disponibilidade no mercado e facilidade de obtenção a partir da fermentação de carboidratos. Como resultado, verificaram que o LA é eficaz em promover algumas

reações orgânicas, sendo responsável por um aumento no rendimento do produto além de facilitar seu o isolamento.

DE MORAIS e colaboradores (2015), avaliaram a toxicidade do HBA ChCl e dos HBDs formados a partir de ácidos, indicando toxicidade moderada, originada principalmente a partir do caráter ácido dos HBDs. Este resultado sugere que a síntese dos DES não é capaz de diminuir a toxicidade oriunda dos ácidos, portanto o uso de HBDs como o LA apresenta características similares ao DES formado a partir de ChCl e ácido láctico.

Os ensaios realizados com CCGLY e GLY não apresentaram diferença significativa de acordo o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para as análises de CFT e FT. O glicerol exibe propriedades intrínsecas de interesse, como baixa toxicidade, biodegradabilidade, obtido a partir de fontes renováveis e baixo custo (DÍAZ-ÁLVAREZ et al., 2011). KARAKASHOV e colaboradores (2015), utilizaram uma solução aquosa de glicerol durante a extração de polifenóis a partir de *Hypericum perforatum* e obtiveram uma extração satisfatória dos compostos alvos (ácido clorogênico e glicosídeos de quercetina) considerada significativamente maior do que a extração com água. O uso da solução de glicerol é fundamentado na mudança de polaridade da água, que age como um eficiente co-solvente além de aumentar o rendimento do produto final de interesse (APOSTOLAKIS; GRIGORAKIS; MAKRIS, 2014).

Sobre os testes realizados com CCP e PROP, houve diferença significativa entre os extratos analisados quanto ao teor de CFT, DPPH, FRAP e FT. O cloreto de colina influenciou positivamente, com exceção ao conteúdo de FT, que foi maior quando utilizado os HBDs. O DES formado por 1,2-propanodiol tem sido pouco aplicado, muito embora alguns estudos indiquem que o solvente apresenta potencial de aplicabilidade durante a obtenção de extratos ricos em biomoléculas (GARCÍA et al., 2016; WAN MAHMOOD et al., 2019).

#### 4.2.4. Determinação das melhores condições de extração

Por meio da avaliação dos parâmetros de extração, as melhores condições de extração: tempo de 150 minutos, temperatura de 65 °C e proporção entre solvente e amostra de 1:30 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). O maior conteúdo de CFT, DPPH e FRAP foi encontrado

nos extratos de CCLA. Quanto a FT, o solvente CCGY apresentou maiores concentrações.

SALVADOR e colaboradores (2011) verificaram a capacidade antioxidante e o teor de compostos fenólicos em folhas de diferentes plantas pertencente à família das Myrtaceae, incluindo a uvaia. Os extratos etanólicos foram obtidos a partir de metodologia convencional a temperatura ambiente, seguido de remoção do solvente e ressuspensão em solução metanólica para as análises de CFT e DPPH. O conteúdo de CFT encontrado foi de 396,2 mg de ácido gálico·g de amostra<sup>-1</sup>, enquanto que a atividade antioxidante apresentou quantidade equivalente a 1,456 mmol de trolox·g de amostra<sup>-1</sup>.

Os resultados não são condizentes aos obtidos neste estudo quanto ao teor de CFT. A melhor extração conduzida (CCLA) exibiu um valor de 163,15 mg de ácido gálico·g de amostra<sup>-1</sup>. Quando comparado os valores obtidos a partir do etanol, os valores foram ainda mais baixos (40,76 mg de ácido gálico·g de amostra<sup>-1</sup>). Com relação a análise de DPPH, os valores encontrados foram próximos, considerando o melhor extrato obtido a partir de CCLA equivalente a 1,14 mmol de trolox·g de amostra<sup>-1</sup>, indicando que a atividade antioxidante é preservada para os DES e o etanol. Mesmo que o conteúdo de CFT seja inferior comparado ao encontrado na literatura, observa-se que a quantidade encontrada referente ao DPPH foi superior considerando a razão entre DPPH e CFT presente na amostra.

A diferença entre os resultados obtidos pode estar correlacionada com a viscosidade dos solventes utilizados que influencia diretamente no processo de transferência de massa. Os DES apresentam viscosidade superior aos solventes orgânicos como o metanol e o etanol, mesmo quando há o emprego de maiores temperaturas. Yadav e colaboradores (2014) verificaram que a viscosidade do DES formado a partir de ChCl e glicerol apresenta valor igual 45,28 mPa.s à 65 °C, enquanto que a viscosidade do metanol à 25 °C é 0.544 mPa.s. O CCGY apresenta viscosidade inferior ao CCLA, indicando que a diferença pode ser ainda mais expressiva.

O metanol é um solvente tóxico para o ser humano e a sua ingestão, mesmo que em pequenas quantidades, pode levar à morte (“Methanol and Ethylene Glycol Intoxication”, 2012). Quando utilizado durante a extração, o metanol deve ser removido por completo, gerando uma etapa adicional no processo de extração. A busca por solventes ecologicamente corretos e de baixa toxicidade representa uma

das melhores alternativas para suprir este problema (DAI et al., 2013c). Alguns DES podem ser empregados sem a necessidade de remoção do solvente devido à baixa toxicidade, exibindo elevado potencial de aplicação (ZHANG et al., 2012).

#### 4.2.5. Comparação entre os métodos de extração: convencional e assistida por ultrassom.

A ESL assistida por ultrassom (UAE) foi realizada para os três solventes selecionados (CCLA, CCP e CCGY) à 65 °C. A nível de comparação, foi analisado o efeito da variação do tempo de extração entre  $t_{\text{inicial}} = 30$  minutos e  $t_{\text{final}} = 180$  minutos, com base nas análises de CFT, DPPH e TF. O uso da UAE tem como principais benefícios o aumento da eficiência e a redução do tempo de extração, devido a melhor penetração na amostra no solvente (CHEMAT et al., 2017). Os resultados obtidos podem ser observados na TABELA 8 e na TABELA 9.

TABELA 8 – TEOR DE CFT, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH E FRAP) E FT DOS EXTRATOS OBTIDOS DAS FOLHAS DE UVAIA EMPREGANDO OS DES CCLA E CCGY, TENDO COMO BASE A INFLUÊNCIA DA VARIÇÃO DO TEMPO DURANTE A UAE<sup>7</sup>

Tempo (min)	CCLA				CCGY			
	CFT(mg·g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	DPPH (mmol·g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	FRAP (mg·g <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	FT (mg·g <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>	CFT(mg·g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	DPPH (mmol·g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	FRAP (mg·g <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	FT (mg·g <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>
30	153,33 <sup>a</sup> ±1,09	0,56 <sup>a</sup> ±0,00	1,28 <sup>a</sup> ±0,01	6,52 <sup>a</sup> ±0,10	125,31 <sup>a</sup> ±0,76	0,54 <sup>a</sup> ±0,00	0,99 <sup>a</sup> ±0,02	3,37 <sup>a</sup> ±0,08
60	147,34 <sup>a</sup> ±1,50	0,56 <sup>a</sup> ±0,00	1,22 <sup>a,b</sup> ±0,00	7,01 <sup>a,b</sup> ±0,45	81,82 <sup>a,b</sup> ±0,86	0,53 <sup>a</sup> ±0,00	1,01 <sup>a</sup> ±0,02	2,81 <sup>a</sup> ±0,00
90	148,64 <sup>a</sup> ±0,91	0,56 <sup>a</sup> ±0,00	1,36 <sup>a,b</sup> ±0,03	8,52 <sup>a,b</sup> ±0,68	125,96 <sup>b</sup> ±0,57	0,54 <sup>a</sup> ±0,00	0,91 <sup>b</sup> ±0,01	2,81 <sup>a</sup> ±0,08
120	160,89 <sup>a,b</sup> ±1,64	0,56 <sup>a,b</sup> ±0,00	1,24 <sup>b</sup> ±0,01	13,20 <sup>a,b</sup> ±1,03	168,50 <sup>c</sup> ±1,72	0,53 <sup>a</sup> ±0,00	1,20 <sup>b,c</sup> ±0,01	4,67 <sup>a</sup> ±0,33
150	175,29 <sup>a,b</sup> ±1,77	0,57 <sup>b,c</sup> ±0,00	1,71 <sup>c</sup> ±0,03	9,98 <sup>a,b</sup> ±0,35	79,48 <sup>c</sup> ±2,57	0,53 <sup>a</sup> ±0,00	0,79 <sup>c</sup> ±0,00	2,91 <sup>a</sup> ±0,04
180	167,27 <sup>b</sup> ±0,00	0,57 <sup>c</sup> ±0,00	1,78 <sup>c</sup> ±0,01	11,14 <sup>b</sup> ±1,51	90,38 <sup>d</sup> ±1,14	0,52 <sup>a</sup> ±0,00	0,70 <sup>d</sup> ±0,00	3,16 <sup>b</sup> ±0,06

FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: <sup>a</sup> CFT (mg de ácido gálico·g de amostra<sup>-1</sup>)

<sup>b</sup> DPPH (mmol de trolox·g de amostra<sup>-1</sup>)

<sup>c</sup> FRAP (mmol de trolox·g de amostra<sup>-1</sup>)

<sup>d</sup> FT (mg de quercetina·g de amostra<sup>-1</sup>)

Valores obtidos por meio de ANOVA *one-way*. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre as amostras por meio do teste de Tukey com  $p \leq 0,05$ .

<sup>7</sup> CCLA: Cloreto de Colina; Ácido Lático; CCGY: Cloreto de Colina; Glicerol.

TABELA 9 – TEOR DE CFT, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH E FRAP) E FT DOS EXTRATOS OBTIDOS DAS FOLHAS DE UVAIA EMPREGANDO O SOLVENTE CCP, TENDO COMO BASE A INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO DO TEMPO DURANTE A UAE<sup>8</sup>

Tempo (min)	CCP				
	CFT(mg·g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	DPPH (mmol·g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	FRAP (mg·g <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	FT (mg·g <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>	
30	101,25 <sup>b</sup> ±4,36	0,48 <sup>e</sup> ±0,00	0,91 <sup>b</sup> ±0,02	4,56 <sup>a</sup> ±0,11	
60	126,66 <sup>a,b</sup> ±2,82	0,47 <sup>a</sup> ±0,00	1,09 <sup>a,b</sup> ±0,01	6,99 <sup>a</sup> ±0,14	
90	89,01 <sup>a,b</sup> ±2,47	0,47 <sup>a</sup> ±0,00	1,09 <sup>a</sup> ±0,00	6,19 <sup>a</sup> ±0,58	
120	109,72 <sup>a,c</sup> ±1,02	0,46 <sup>a</sup> ±0,00	1,05 <sup>a</sup> ±0,03	7,42 <sup>a</sup> ±0,82	
150	106,58 <sup>a,c</sup> ±2,71	0,47 <sup>a</sup> ±0,00	1,60 <sup>a</sup> ±0,01	5,54 <sup>a</sup> ±0,38	
180	112,81 <sup>c</sup> ±0,25	0,46 <sup>e</sup> ±0,00	1,14 <sup>b</sup> ±0,04	6,97 <sup>a</sup> ±0,35	

FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: <sup>a</sup> CFT (mg de ácido gálico·g de amostra<sup>-1</sup>)

<sup>b</sup> DPPH (mmol de trolox·g de amostra<sup>-1</sup>)

<sup>c</sup> FRAP (mmol de trolox·g de amostra<sup>-1</sup>)

<sup>d</sup> FT (mg de quercetina·g de amostra<sup>-1</sup>)

Valores obtidos por meio de ANOVA *one-way*. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre as amostras por meio do teste de Tukey com  $p \leq 0,05$ .

<sup>8</sup> CCP: Cloreto de Colina: 1,2 – Propanodiol.

O conteúdo de CFT o tempo 150 minutos foi considerado de maior eficiência para o solvente CCLA, enquanto que para CCGY e CCP, o tempo de 120 minutos apresentou maiores concentrações. Na extração conduzida com CCGY a diferença de CFT no tempo 150 minutos foi mais expressiva variando de 168,50 e 79,48 mg de ácido gálico·g amostra<sup>-1</sup> na devida ordem. Diante desse resultado, houve uma redução do tempo de extração promovida pela técnica UAE. Para CCP a diferença não foi significativa, indicando um aumento de aproximadamente 2 mg de ácido gálico·g amostra<sup>-1</sup>.

Sobre o conteúdo de FT nos extratos de uvaia, o tempo de 120 minutos apresentou o melhor desempenho para os três solventes, com concentrações que variaram de 4,67 a 13,20 mg de quercetina·g de amostra<sup>-1</sup> para CCGY e CCLA, respectivamente. Os resultados obtidos de FT também demonstraram que o emprego da técnica UAE reduz o tempo de extração no caso em estudo, sendo que a diminuição foi de 30 minutos com relação as extrações conduzidas em célula convencional.

A respeito da atividade antioxidante (DPPH), foi observado que houve pequenas diferenças de concentração entre todos os tempos avaliados. O maior conteúdo encontrado corresponde a extração realizada com CCLA (0,57 mmol de trolox·g amostra<sup>-1</sup>), no tempo de 150 minutos e o menor conteúdo foi obtido para o CCP (0,46 mmol de trolox·g amostra<sup>-1</sup>) em 120 minutos de extração.

Através da análise estatística, foi verificado que para todas as análises realizadas que não houve diferença significativa para o solvente CCLA entre os tempos de 30 e 90 minutos. Com relação ao solvente CCGY, não houve diferença significativa no conteúdo de DPPH e FT, indicando que 30 minutos de extração é suficiente. Os resultados obtidos são compatíveis com os dados de LIU e colaboradores (2019), que também observaram que não houve acréscimo na eficiência de extração com relação aos tempos de 30, 40 e 50 minutos.

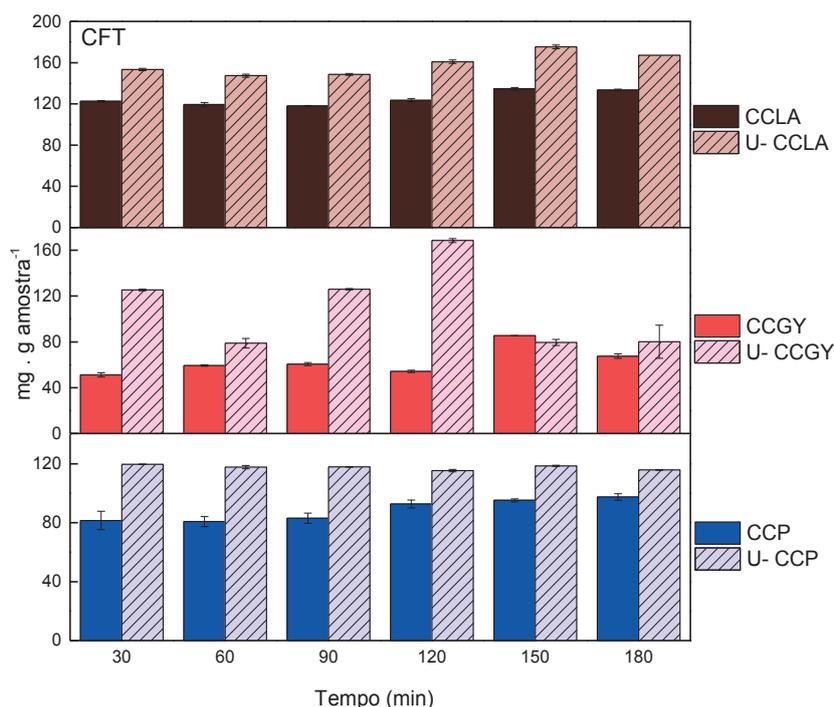
MENG e colaboradores (2018), avaliaram a otimização do tempo de extração ( $t_{\text{inicial}} = 15$  minutos e  $t_{\text{final}} = 60$  minutos) de flavonoides provenientes de *Pollen Typhae* utilizando UAE. Os resultados indicaram que não houve aumento significativo do rendimento para tempos superiores a 35 minutos, e que existe um equilíbrio dinâmico entre as amostras e o tempo de UAE.

Adicionalmente, estudos disponíveis na literatura verificaram o efeito de degradação promovida pela UAE em alimentos ricos em atividade antioxidante.

Foi observado que existe um tempo limite para que a extração seja eficiente, sendo que tempos superiores podem causar uma degradação de compostos devido ao efeito da sonicação como observado na FIGURA 13 para os extratos obtidos a partir do solvente CCGY. Outras propriedades de interesse como a cor e as características físico-químicas também podem ser modificadas pela técnica de UAE (PINGRET; FABIANO-TIXIER; CHEMAT, 2013).

A FIGURA 13, FIGURA 14 e FIGURA 15 ilustram os dados obtidos de CFT, DPPH e FT á 65 °C correlacionando a eficiência das técnicas convencional e UAE. Sobre o conteúdo de CFT (FIGURA 13), houve um sutil acréscimo de concentração para os solventes CCLA e CCP utilizando UAE. Já para o solvente CCGY, foi verificada uma concentração três vezes maior na extração conduzida com UAE, demonstrando a efetividade da técnica.

FIGURA 13 – RELAÇÃO ENTRE VARIAÇÃO DE TEMPO E CONCENTRAÇÃO CFT COMPARANDO AS TÉCNICAS UAE E CONVENCIONAL<sup>9</sup>



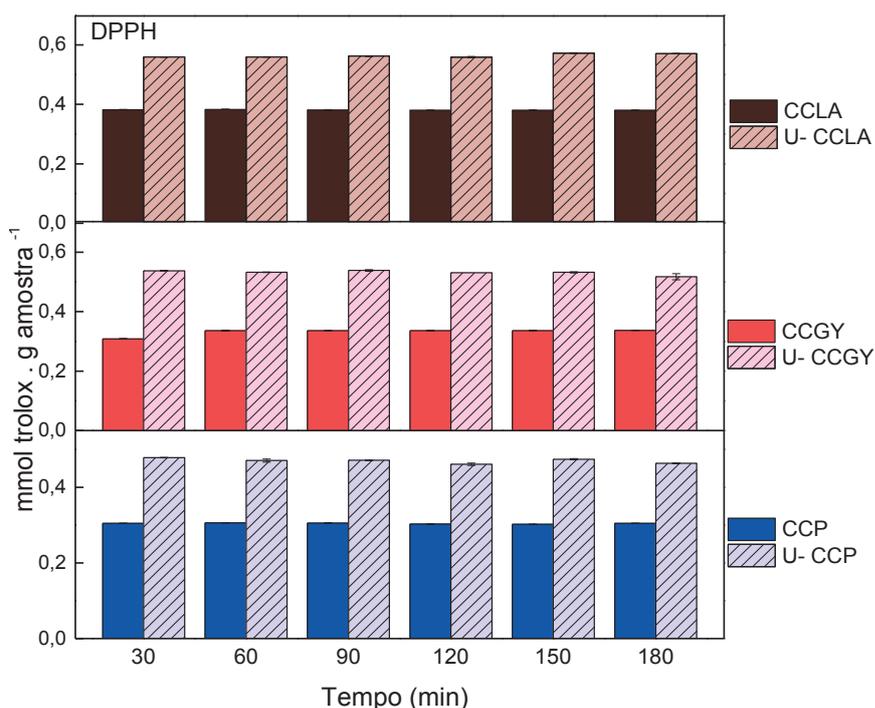
FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: CFT (mg de ácido gálico.g amostra<sup>-1</sup>).

<sup>9</sup> CCLA: Cloreto de Colina: Ácido Láctico; U-CCLA: Ultrassom Cloreto de Colina: Ácido Láctico; CCGY: Cloreto de Colina: Glicerol; U-CCGY: Ultrassom Cloreto de Colina: Glicerol; CCP: Cloreto de Colina: 1,2 – Propanodiol; U-CCP: Ultrassom Cloreto de Colina: 1,2 – Propanodiol.

Acerca da análise de DPPH (FIGURA 14) foi observado maior preservação da atividade antioxidante a partir do emprego de UAE para os três solventes testados, de forma que foi verificado a manutenção da atividade com a variação do tempo de extração, indicando que este fator não é responsável por gerar degradações para o tempo máximo de 180 minutos de extração. Sobre o conteúdo de FT (FIGURA 15) a extração conduzida com UAE foi mais eficiente para todos os tempos testados e para os três solventes analisados quando comparado à técnica convencional. A extração conduzida com o solvente CCGY foi o que apresentou a maior diferença entre os conteúdos encontrados de FT, de forma que a UAE possibilitou a extração de 13,20 mg de quercetina·g de amostra<sup>-1</sup>.

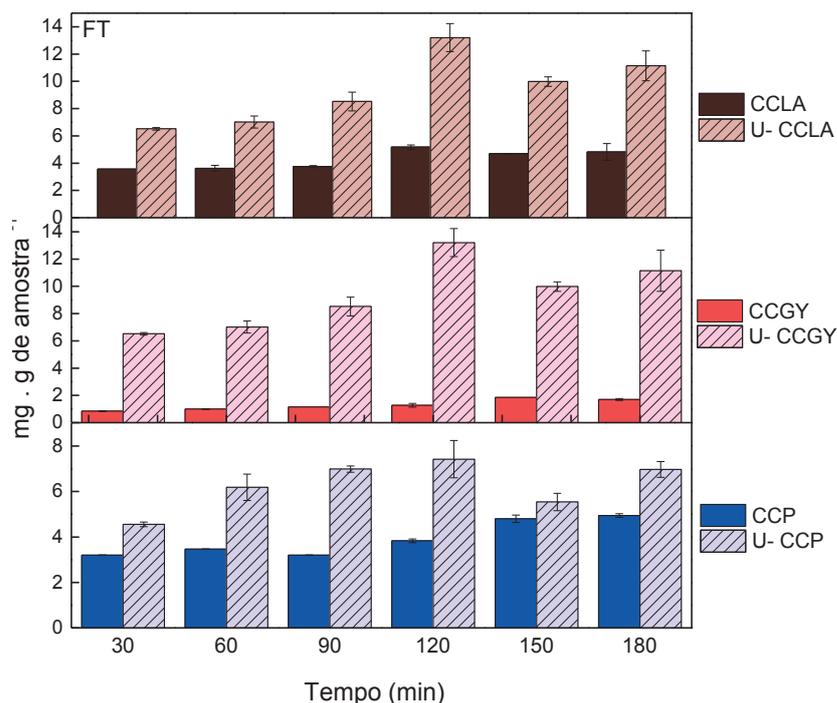
FIGURA 14 – RELAÇÃO ENTRE VARIAÇÃO DE TEMPO E CONCENTRAÇÃO DPPH COMPARANDO AS TÉCNICAS UAE E CONVENCIONAL<sup>10</sup>



FONTE: A autora (2020).

<sup>10</sup> CCLA: Cloreto de Colina: Ácido Lático; U-CCLA: Ultrassom Cloreto de Colina: Ácido Lático; CCGY: Cloreto de Colina: Glicerol; U-CCGY: Ultrassom Cloreto de Colina: Glicerol; CCP: Cloreto de Colina: 1,2 – Propanodiol; U-CCP: Ultrassom Cloreto de Colina: 1,2 – Propanodiol.

FIGURA 15 – RELAÇÃO ENTRE VARIAÇÃO DE TEMPO E CONCENTRAÇÃO FT COMPARANDO AS TÉCNICAS UAE E CONVENCIONAL<sup>11</sup>.



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: FT (mg de quercetina.g de amostra<sup>-1</sup>).

ALI e colaboradores (2019), avaliaram a eficiência da extração de flavonoides provenientes de frutos da *Lycium barbarum L.* por meio das técnicas convencional (aquecimento e agitação) e UAE. Como resultado, verificaram que a técnica convencional foi pouco eficiente. Os autores também justificam o emprego da UAE devido ao aumento da área superficial de contato da biomolécula a partir do colapso das bolhas geradas por meio do processo de cavitação, na qual a técnica é baseada. Dessa forma, o processo de transferência de massa é favorecido e conseqüentemente, capaz de gerar um aumento no conteúdo de flavonoides na matriz.

<sup>11</sup> CCLA: Cloreto de Colina: Ácido Lático; U-CCLA: Ultrassom Cloreto de Colina: Ácido Lático; CCGY: Cloreto de Colina: Glicerol; U-CCGY: Ultrassom Cloreto de Colina: Glicerol; CCP: Cloreto de Colina: 1,2 – Propanodiol; U-CCP: Ultrassom Cloreto de Colina: 1,2 – Propanodiol.

### 4.3. Avaliação da atividade antimicrobiana

Os compostos bioativos podem atuar de forma efetiva como agentes antimicrobianos. Após a verificação do potencial dos extratos com relação ao conteúdo de compostos fenólicos, é relevante investigar o potencial de inibição de micro-organismos patogênicos. Puupponen-Pimiä; Nohynek; Meier (2001), verificaram a ação de compostos fenólicos puros (flavonoides e ácidos fenólicos) comprovando a ação eficaz contra bactérias lácticas encontradas no trato gastrointestinal humano, devido à presença das miricetina. Também foi verificada a ação desses extratos contra *Salmonella*, entre outras bactérias gram-negativas e gram-positivas.

Os extratos de folhas de uvaia obtidos a partir condições ótimas e solventes selecionados (CCLA, CCGY e CCP) foram submetidos a análise de atividade antimicrobiana frente as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria Monocytogenes*, *Salmonella sp.* e *Escherichia Coli*. O controle positivo foi determinado a partir de Chloramphenicol e o controle negativo a partir dos solventes puros (LA, GLY e PROP). Os resultados referentes aos halos de inibição e porcentagem inibida estão dispostos na TABELA 9.

Em questão de efetividade, o extrato obtido a partir de CCP apresentou algum halo de inibição frente a quase todas as bactérias testadas, com exceção da *Escherichia Coli*. De acordo com as faixas mínimas de inibição estipuladas por CLSI (2015), nenhum dos solventes testados alcançaram valores de halos significantes comparado ao antibiótico utilizado Chloramphenicol.

Não foram encontrados na literatura dados referentes a atividade antimicrobiana de extratos da uvaia obtidos a partir do emprego dos DES. CHAVASCO e colaboradores (2014) avaliaram o potencial antimicrobiano de diversas partes da uvaia, incluindo seus frutos e folhas utilizando etanol como solvente. Os resultados encontrados indicaram que o extrato proveniente das folhas inibiu quase todos os micro-organismos testados, devido à presença de flavonoides, taninos e saponinas no extrato.

Souza e colaboradores (2014), realizaram um estudo similar, avaliando o potencial de extratos de uvaia. Os autores indicam inibição, principalmente para o extrato hidroalcoólico e a partir do acetato de etila. A presença de atividade

antimicrobiana é justificada pela presença dos taninos e compostos fenólicos. A diferença entre os resultados deste estudo e os encontrados pelos autores citados acima, pode estar relacionada ao solvente utilizado, método de extração e os micro-organismos testados, uma vez que a presença relevante dos compostos fenólicos e dos flavonoides pode ser observada em ambos os trabalhos.

A pesquisa conduzida por Souza e colaboradores (2014), foi realizada em microplacas, técnica diferente da aplicada neste estudo. Adicionalmente, os autores utilizaram solventes de alta toxicidade (hexano, clorofórmio e etanol), prejudiciais à saúde do ser humano. Mesmo que em pequenas quantidades podem causar problemas, pois seus resíduos contaminam a água e o solo, a título de exemplo (JOSHI; ADHIKARI, 2019).

Com relação ao solvente utilizado, é importante destacar que o ácido láctico apresenta atividade antimicrobiana principalmente contra bactérias gram-positivas (STANOJEVIĆ-NIKOLIĆ et al., 2016). Para alguns micro-organismos testados, o halo de inibição encontrado foi referente a ação do ácido láctico, principalmente com relação ao *Clostridium perfringens*, *Escherichia Coli* e *Staphylococcus aureus*, considerando que duas delas pertencem ao grupo das gram-positivas. Para as situações nas quais o solvente apresenta elevada capacidade antimicrobiana, é fundamental investigar a necessidade de sua remoção. Referente aos outros solventes (GLY e PROP), não houve a formação de halos de inibição nas amostras referentes ao controle negativo, demonstrando que a efetividade antimicrobiana foi somente referente ao extrato de folhas de uvaia

TABELA 10 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE AS BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS DOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DE FOLHAS DE UVAIA EMPREGANDO OS SOLVENTES CCLA, CCGY E CCP

Solvente	Bactérias Gram-positivas				Bactérias Gram-negativas					
	<i>Staphylococcus aureus</i> (mm)	(%)	<i>Clostridium perfringens</i> (mm)	(%)	<i>Listeria Monocytogenes</i> (mm)	(%)	<i>Salmonella sp.</i> (mm)	(%)	<i>Escherichia Coli</i> (mm)	(%)
Antibiótico	29,86 <sup>a</sup> ± 0,84		28,37 <sup>a</sup> ± 1,66		28,37 <sup>a</sup> ± 0,95		28,94 <sup>a</sup> ± 0,84		28,88 <sup>a</sup> ± 1,66	
CCLA	4,20 <sup>b</sup> ± 0,68	14,35	-	-	2,98 <sup>b</sup> ± 0,45	10,50	11,84 <sup>b</sup> ± 1,81	40,91	-	-
CCGY	-		-	-	-	-	-	-	8,57 <sup>b</sup> ± 0,14	29,67
CCP	9,49 <sup>c</sup> ± 0,44	32,43	7,97 <sup>b</sup> ± 0,22	28,09	9,04 <sup>c</sup> ± 10,10	31,86	7,49 <sup>b</sup> ± 0,13	25,88	-	-

FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: <sup>a</sup> Valores obtidos por meio de ANOVA one-way. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre as amostras por meio do teste de Tukey com p≤0,05.

## 5. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A aplicação dos extratos obtidos, assim como sua toxicidade e estabilidade são parâmetros que podem ser explorados a fim de determinar seu potencial de uso. Além deste fator, devido aos estudos disponíveis na literatura, os frutos de uvaia exibem capacidade antioxidante e antimicrobiana por meio de extratos obtidos a partir de solventes convencionais, apresentando alto potencial de exploração através do emprego dos solventes eutéticos profundos.

SGANZERLA e colaboradores (2018), verificaram capacidade antioxidante de extratos a partir da homogeneização dos frutos de uvaia para três solventes (água, etanol puro e etanol 70%). A extração aquosa apresentou maiores quantidades de CFT (3470 mg de ácido gálico·g de amostra<sup>-1</sup>). Sobre o conteúdo de FT e atividade antioxidante (DPPH, FRAP e ABTS), o solvente hidroalcoólico exibiu maiores concentrações. Os valores encontrados foram similares aos de DA SILVA e colaboradores (2019), que analisaram seis espécies diferentes de frutos da uvaia a partir de extração convencional com agitação e mistura de acetona: hexano (4:6) como solvente. A concentração máxima de CFT (4130 mg de ácido gálico·g de amostra<sup>-1</sup>) foi encontrada para a “Rugosa Doce”.

A avaliação do potencial antioxidante *in vivo* tanto para os extratos obtidos neste estudo como de extratos provenientes dos frutos da uvaia, representam uma análise de elevada importância, responsável por identificar atividade anticancerígena como exemplo. O comportamento dos compostos bioativos dentro do organismo humano depende de diversos fatores que somente uma análise neste nível de precisão pode fornecer.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste trabalho demonstraram que os extratos obtidos de folhas de uvaia utilizando os solventes eutéticos profundos (DES) apresentam elevado potencial antioxidante.

A diversidade de DES testados corroborou para que o melhor solvente pudesse ser selecionado, e a investigação das melhores condições de processamento (dentre as condições avaliadas) foi fundamental para o aumento da eficiência do processo de extração. As melhores condições foram temperatura de 65 °C, tempo de 150 minutos e razão entre amostra e solvente de 1:30 (g·mL<sup>-1</sup>). Entre os DES selecionados, o CCLA apresenta destaque com relação a todas as análises realizadas (CFT, DPPH, FRAP e FT).

Quanto ao emprego de solventes convencionais (água e etanol), todos os DES apresentaram valores superiores quanto ao conteúdo de CFT e atividade antioxidante (DPPH e FRAP). Para a análise de FT, o solvente MLA (DES hidrofóbico avaliado nas etapas finais) exibiu as maiores concentrações. Já os HBDs exibiram alta capacidade de extração com ênfase para o LA, que apresentou altas concentrações de CFT e FT.

O acoplamento da técnica de ultrassom foi capaz de reduzir o tempo de extração de 150 minutos para 30 minutos, sem apresentar diferença significativa para todas análises no extrato obtido por CCLA. A técnica também foi capaz de aumentar em três vezes a concentração em todas as análises conduzidas para o solvente CCP.

Com relação às análises testes de atividade antioxidante, verificou que os extratos encontrados não exibem halos de inibição suficiente para o antibiótico utilizado em relação as bactérias testadas (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.*, *Escherichia Coli*).

## REFERÊNCIAS

2007. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. [s.l.: s.n.].

ABBOTT, A. P. et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. **Chemical Communications**, v. 9, n. 1, p. 70–71, 2003.

ABBOTT, A. P. et al. Deep Eutectic Solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: Versatile alternatives to ionic liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 29, p. 9142–9147, 2004.

ABDUL HADI, N. et al. Performance of Choline-Based Deep Eutectic Solvents in the Extraction of Tocols from Crude Palm Oil. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, 2015.

ALI, M. C. et al. Effective extraction of flavonoids from *Lycium barbarum* L. fruits by deep eutectic solvents-based ultrasound-assisted extraction. **Talanta**, v. 203, p. 16–22, 1 out. 2019.

ANGELA, M. DE S. et al. In vitro effects of *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae: Antimicrobial activity and synergistic interactions with Vancomycin and Fluconazole. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 35, p. 862–867, 2014.

APEL, M. A. et al. Chemical composition of the essential oils of *eugenia beaurepaireana* and *eugenia pyriformis*: section *dichotomae*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 3, p. 191–192, 2004.

APOSTOLAKIS, A.; GRIGORAKIS, S.; MAKRIS, D. P. Optimisation and comparative kinetics study of polyphenol extraction from olive leaves (*Olea europaea*) using heated water/glycerol mixtures. **Separation and Purification Technology**, v. 128, p. 89–95, 13 maio 2014.

BAJKACZ, S.; ADAMEK, J. Evaluation of new natural deep eutectic solvents for the extraction of isoflavones from soy products. **Talanta**, 2017.

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

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 1 jan. 2006.

BARBIERI, J. B. et al. Deep eutectic solvents applied in the extraction and stabilization of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) phenolic compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 144, p. 112049, 1 fev. 2020.

BARZOTTO, I. L. M. et al. Supercritical extraction of *Eugenia involucrata* leaves: Influence of operating conditions on yield and  $\alpha$ -tocopherol content. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 143, p. 55–63, 1 jan. 2019.

BENNETT, G. Hawley's condensed chemical dictionary. **Journal of Hazardous Materials**, 1989.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, 1996.

BERK, Z. **Food Process Engineering and Technology**. [s.l: s.n.].

BLOOD, V. S. C. G. D. **Saunders Comprehensive Veterinary Dictionary, 4th edition**. Saunders L ed. [s.l: s.n.]. v. 59

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity**LWT - Food Science and Technology, 1995.

BRENNECKE, J. F.; MAGINN, E. J. **Ionic liquids: Innovative fluids for chemical processing**AIChE Journal, 2001.

BREWER, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 221–247, 2011.

BURTON, G. R. W.; ENGELKIRK, P. G. Microbiology for the Health Sciences. **Journal of Experimental Psychology: General**, 2003.

CAMEL, V. Recent extraction techniques for solid matrices - Supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: Their potential and pitfalls. **Analyst**, v. 126, n. 7, p. 1182–1193, 2001.

CAO, J. et al. Well-Designed Hydrophobic Deep Eutectic Solvents As Green and Efficient Media for the Extraction of Artemisinin from *Artemisia annua* Leaves. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, 2017.

CAO, J. et al. Efficient extraction of proanthocyanidin from *Ginkgo biloba* leaves employing rationally designed deep eutectic solvent-water mixture and evaluation of the antioxidant activity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 158, p. 317–326, 5 set. 2018.

CARINA BILUCA, F. et al. Investigation of phenolic compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities in stingless bee honey (*Meliponinae*). **Food Research International**, p. 108756, 27 nov. 2019.

CARRIAZO, D. et al. **Deep-eutectic solvents playing multiple roles in the synthesis of polymers and related materials**Chemical Society Reviews,

2012.

CASSOL, L.; RODRIGUES, E.; ZAPATA NOREÑA, C. P. Extracting phenolic compounds from *Hibiscus sabdariffa* L. calyx using microwave assisted extraction. **Industrial Crops and Products**, 2019.

CHAVASCO, J. M. et al. Avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de extratos de plantas do cerrado do Sul de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 56, n. 1, p. 13–20, 2014.

CHEMAT, F. et al. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 540–560, 1 jan. 2017.

CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813–835, 1 jul. 2011.

CHEYNIER, V. Phenolic compounds: From plants to foods. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 2–3, p. 153–177, 2012.

CIARLINI, J. J. S.; MARANGONI, A.; BOLZAN, A. Selectivity of supercritical CO<sub>2</sub> extraction and atmospheric pressure techniques for the major volatile compounds of *Eugenia involucrata* leaves from Southern Brazil. **Food and Bioproducts Processing**, v. 106, p. 29–34, 1 nov. 2017.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement Clinical and Laboratory Standards Institute**. [s.l: s.n.]. v. 32

CRAVEIRO, R. et al. Properties and thermal behavior of natural deep eutectic solvents. **Journal of Molecular Liquids**, v. 215, p. 534–540, 2016.

CVJETKO BUBALO, M. et al. A brief overview of the potential environmental hazards of ionic liquids. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 99, p. 1–12, 1 jan. 2014.

CVJETKO BUBALO, M. et al. Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. **Food Chemistry**, v. 200, p. 159–166, 1 jun. 2016.

DA CUNHA, F. A. B. et al. Cytotoxic and antioxidative potentials of ethanolic extract of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) leaves on human blood cells.

**Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 614–621, 1 dez. 2016.

DA SILVA, A. P. G. et al. Chemical composition, nutritional value and bioactive compounds in six uvaia accessions. **Food Chemistry**, v. 294, p. 547–556, 1 out. 2019.

DAI, Y. et al. Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *carthamus tinctorius* L. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 13, p. 6272–6278, 2013a.

- DAI, Y. et al. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. **Analytica Chimica Acta**, 2013b.
- DAI, Y. et al. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. **Analytica Chimica Acta**, v. 766, p. 61–68, 5 mar. 2013c.
- DAI, Y.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). **Food Chemistry**, 2014.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Fennema's Food Chemistry (4th Edition)**. [s.l.: s.n.].
- DAVID R LIDE. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 84th Edition, 2003-2004. **Handbook of Chemistry and Physics**, 2003.
- DE MORAIS, P. et al. Ecotoxicity of Cholinium-Based Deep Eutectic Solvents. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 3, n. 12, p. 3398–3404, 2015.
- DENG, J. et al. Comparative evaluation of maceration and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from fresh olives. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 37, p. 328–334, 1 jul. 2017.
- DEVATKAL, S. K.; NARSAIAH, K.; BORAH, A. Anti-oxidant effect of extracts of kinnow rind, pomegranate rind and seed powders in cooked goat meat patties. **Meat Science**, v. 85, n. 1, p. 155–159, 2010.
- DHINGRA, D. et al. Dietary fibre in foods: A review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 3, p. 255–266, 2012.
- DÍAZ-ÁLVAREZ, A. E. et al. Glycerol and derived solvents: New sustainable reaction media for organic synthesis. **Chemical Communications**, v. 47, n. 22, p. 6208–6227, 2011.
- DOBLE, M. et al. Alternate Solvents. **Green Chemistry and Engineering**, p. 93–104, 1 jan. 2007.
- DOMÍNGUEZ DE MARÍA, P.; MAUGERI, Z. **Ionic liquids in biotransformations: From proof-of-concept to emerging deep-eutectic-solvents** *Current Opinion in Chemical Biology*, 2011.
- DREVELEGKA, I.; GOULA, A. M. Recovery of grape pomace phenolic compounds through optimized extraction and adsorption processes. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 149, p. 107845, 1 mar. 2020.
- EL KANTAR, S. et al. Green extraction of polyphenols from grapefruit peels using high voltage electrical discharges, deep eutectic solvents and aqueous

glycerol. **Food Chemistry**, v. 295, p. 165–171, 15 out. 2019.

FILHO, G. L. et al. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of carotenoids from pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 46, n. 1, p. 33–39, 1 ago. 2008.

GARCÍA, A. et al. Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESs). **Food Chemistry**, 2016.

GARMUS, T. T. et al. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 86, p. 4–14, 1 fev. 2014.

GHALY, A. E.; ALKOAİK, F. N. Extraction of protein from common plant leaves for use as human food. **American Journal of Applied Sciences**, v. 7, n. 3, p. 323–334, 2010.

GONÇALVES RODRIGUES, L. G. et al. Recovery of bioactive phenolic compounds from papaya seeds agroindustrial residue using subcritical water extraction. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101367, 1 nov. 2019.

GUSTAVO SGANZERLA, W. et al. Nutritional, physicochemical and antimicrobial properties of uvaia pulp (*Eugenia pyriformis* Cambess). **Communications in Plant Sciences**, p. 1–7, 2018.

HALLIWELL, B. Antioxidants and Human Disease: A General Introduction. **Nutrition Reviews**, v. 55, n. 1, p. S44–S49, 2009.

HAMED, Y. S. et al. Extraction, purification by macrospores resin and in vitro antioxidant activity of flavonoids from *Moringa oleifera* leaves. **South African Journal of Botany**, v. 124, p. 270–279, 1 ago. 2019.

HAMINIUK, C. W. I. et al. Extraction and quantification of phenolic acids and flavonols from *Eugenia pyriformis* using different solvents. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 10, p. 2862–2866, 2014.

HAMMOND, O. S.; BOWRON, D. T.; EDLER, K. J. The Effect of Water upon Deep Eutectic Solvent Nanostructure: An Unusual Transition from Ionic Mixture to Aqueous Solution. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 56, n. 33, p. 9782–9785, 2017.

HANSEN, C. M. **Hansen solubility parameters: A user's handbook: Second edition**. [s.l.: s.n.].

HASHEMI-MOGHADDAM, H. et al. Microwave accelerated distillation of essential oils from the leaves of *eucalyptus microtheca*: Optimization and comparison with conventional hydrodistillation. **Asian Journal of Chemistry**, 2013.

HSIEH, Y.-H. et al. Ultrasonication-assisted synthesis of alcohol-based deep

eutectic solvents for extraction of active compounds from ginger. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 63, p. 104915, 1 maio 2020.

HU, B. et al. A method for extracting oil from tea (*Camelia sinensis*) seed by microwave in combination with ultrasonic and evaluation of its quality. **Industrial Crops and Products**, 2019.

HUANG, J. et al. **Ionic deep eutectic solvents for the extraction and separation of natural products** **Journal of Chromatography A**, 2019.

IRAKLI, M.; CHATZOPOULOU, P.; EKATERINIADOU, L. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds: Oleuropein, phenolic acids, phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 382–388, 15 nov. 2018.

JACOMINO, A. P. et al. Uvaia— *Eugenia pyriformis* Cambess. **Exotic Fruits**, p. 435–438, 2018.

JEONG, K. M. et al. One-step sample preparation for convenient examination of volatile monoterpenes and phenolic compounds in peppermint leaves using deep eutectic solvents. **Food Chemistry**, 2018.

JIAO, T. et al. Separation of phenolic compounds from coal tar via liquid-liquid extraction using amide compounds. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, 2015.

JOSHI, D. R.; ADHIKARI, N. An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity. **Journal of Pharmaceutical Research International**, v. 28, n. 3, p. 1–18, 2019.

KARAKASHOV, B. et al. Optimisation of polyphenol extraction from *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) using aqueous glycerol and response surface methodology. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2015.

KARIMI, M.; SHABANI, A. M. H.; DADFARNIA, S. Deep eutectic solvent-mediated extraction for ligand-less preconcentration of lead and cadmium from environmental samples using magnetic nanoparticles. **Microchimica Acta**, 2016.

KHANDELWAL, S.; TAILOR, Y. K.; KUMAR, M. **Deep eutectic solvents (DESs) as eco-friendly and sustainable solvent/catalyst systems in organic transformations** **Journal of Molecular Liquids**, 2016.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 2328–2375, 2013.

KLEIN, E. J. et al. Use of supercritical CO<sub>2</sub> and ultrasound-assisted extractions to obtain  $\alpha/\beta$ -amyrin-rich extracts from uvaia leaves (*Eugenia pyriformis*)

Cambess.). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 137, p. 1–8, 1 jul. 2018.

KUDŁAK, B.; OWCZAREK, K.; NAMIEŚNIK, J. Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 16, p. 11975–11992, 2015.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products:: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 167–198, 1 abr. 2003.

LIU, P. et al. **Recent advances in the application of deep eutectic solvents as sustainable media as well as catalysts in organic reactions**RSC **Advances**, 2015.

LIU, Y. et al. Enhanced extraction of natural pigments from *Curcuma longa* L. using natural deep eutectic solvents. **Industrial Crops and Products**, v. 140, p. 111620, 15 nov. 2019.

LUQUE-GARCÍA, J. L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. **Ultrasound: A powerful tool for leaching**TrAC - **Trends in Analytical Chemistry**, 2003.

MARSH, K. N. et al. **Room Temperature Ionic Liquids as Replacements for Conventional Solvents - A Review**Korean **Journal of Chemical Engineering**, 2002.

MARTINEZ-CORREA, H. A. et al. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 3, p. 998–1006, 1 jan. 2011.

MARTINS, M. A. R.; PINHO, S. P.; COUTINHO, J. A. P. Insights into the Nature of Eutectic and Deep Eutectic Mixtures. **Journal of Solution Chemistry**, 2019.  
MAUL, A. A.; WASICKY, R.; BACCHI, E. M. Extração por fluido supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, n. 2, 1996.

MENG, Z. et al. Green and efficient extraction of four bioactive flavonoids from *Pollen Typhae* by ultrasound-assisted deep eutectic solvents extraction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 161, p. 246–253, 30 nov. 2018.

Methanol and Ethylene Glycol Intoxication. **Critical Care Clinics**, v. 28, n. 4, p. 661–711, 1 out. 2012.

MOHAMMADPOUR, H. et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of *Moringa peregrina* oil with response surface methodology and comparison with Soxhlet method. **Industrial Crops and Products**, v. 131, p. 106–116, 1 maio 2019.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal**

of **Chromatography A**, v. 1054, n. 1–2, p. 95–111, 29 out. 2004.

NEGI, J. S.; SINGH, P.; RAWAT, B. Chemical Constituents and Biological Importance of Swertia: A Review. **Current Research in Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 1–15, 2011.

NULWALA, H.; MIRJAFARI, A.; ZHOU, X. **Ionic liquids and poly(ionic liquid)s for 3D printing – A focused mini-review** **European Polymer Journal**, 2018.

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

PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential Oils from Neotropical Myrtaceae : Chemical Diversity and Biological Properties. v. 8, p. 73–94, 2011.

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

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, n. 12, p. 1995–2018, 1 dez. 1998.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais: introdução as principais substâncias bioativas em alimentos**. [s.l.: s.n.].

PINELO, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, M. J. Mass transfer during continuous solid–liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 1, p. 57–63, 1 nov. 2006.

PINGRET, D.; FABIANO-TIXIER, A.-S.; CHEMAT, F. Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 593–606, 1 jun. 2013.

PROMMUAK, C.; DE-EKNAMKUL, W.; SHOTIPRUK, A. Extraction of flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxidant activity of extracts. **Separation and Purification Technology**, v. 62, n. 2, p. 444–448, 1 set. 2008.

PUBCHEM. **PubChem Compound**.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 4, p. 494–507, 2001.

QUIDEAU, S. et al. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50, n. 3, p. 586–621, 2011.

RADOŠEVIĆ, K. et al. Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 112, p. 46–53, 1 fev. 2015.

RADOŠEVIĆ, K. et al. Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. **LWT - Food Science and Technology**, 2016.

REBOREDO-RODRÍGUEZ, P. et al. Characterization of phenolic extracts from Brava extra virgin olive oils and their cytotoxic effects on MCF-7 breast cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 119, p. 73–85, 1 set. 2018.

RIBEIRO, B. D. et al. Menthol-based eutectic mixtures: Hydrophobic low viscosity solvents. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 3, n. 10, p. 2469–2477, 2015.

ROCHA, J. DE C. G. et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from jussara (*Euterpe edulis* M.) and blueberry (*vaccinium myrtillus*) fruits. **Food Science and Technology**, 2018.

RODSAMRAN, P.; SOTHORNVIT, R. Extraction of phenolic compounds from lime peel waste using ultrasonic-assisted and microwave-assisted extractions. **Food Bioscience**, 2019.

RUFINO, M. DO S. M. et al. Metodologia Científica: determinação da atividade antioxidantes total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Comunicado Técnico 125**, 2006.

SAFDAR, M. N. et al. Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 3, p. 488–500, 1 jul. 2017.

ŞAHİN, S. Tailor-designed deep eutectic liquids as a sustainable extraction media: An alternative to ionic liquids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 174, p. 324–329, 10 set. 2019.

SALVADOR, M. J. et al. Antioxidant capacity and phenolic content of four myrtaceae plants of the South of Brazil. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 7, p. 977–982, 2011.

SARDI, J. DE C. O. et al. Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 280–287, 1 abr. 2017.

SATLEWAL, A. et al. Natural deep eutectic solvents for lignocellulosic biomass pretreatment: Recent developments, challenges and novel opportunities. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 8, p. 2032–2050, 1 dez. 2018.

SAVI, L. K. et al. Influence of temperature, water content and type of organic

acid on the formation, stability and properties of functional natural deep eutectic solvents. **Fluid Phase Equilibria**, v. 488, p. 40–47, 1 jun. 2019.

SHAFIE, M. H.; YUSOF, R.; GAN, C.-Y. Synthesis of citric acid monohydrate-choline chloride based deep eutectic solvents (DES) and characterization of their physicochemical properties. **Journal of Molecular Liquids**, v. 288, p. 111081, 15 ago. 2019.

SHAHIDI, F. Antioxidants: Principles and applications. **Handbook of Antioxidants for Food Preservation**, p. 1–14, 1 jan. 2015.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic Antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 1992.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. [s.l.: s.n.].

SIEBERT, D. A. et al. Determination of phenolic profile by HPLC-ESI-MS/MS and anti-inflammatory activity of crude hydroalcoholic extract and ethyl acetate fraction from leaves of *Eugenia brasiliensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 459–465, 1 jul. 2017.

SIM, Y. Y.; JESS ONG, W. T.; NYAM, K. L. Effect of various solvents on the pulsed ultrasonic assisted extraction of phenolic compounds from *Hibiscus cannabinus* L. leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 140, p. 111708, 15 nov. 2019.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A.; JR, J. COLORIMETRY OF TOTAL PHENOLICS WITH A C I D REAGENTS. **Am J Enol Vitic**, 1965.

SMITH, J. M. Thermodynamics. **Industrial and Engineering Chemistry**, 1961.

SOBEH, M. et al. Chemical profiling of secondary metabolites of *Eugenia uniflora* and their antioxidant, anti-inflammatory, pain killing and anti-diabetic activities: A comprehensive approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 240, p. 111939, 10 ago. 2019.

STANOJEVIĆ-NIKOLIĆ, S. et al. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Against Pathogen and Spoilage Microorganisms. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 40, n. 5, p. 990–998, 2016.

THUY PHAM, T. P.; CHO, C.-W.; YUN, Y.-S. Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. **Water Research**, v. 44, n. 2, p. 352–372, 1 jan. 2010.

VICTORIA, F. N. et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2668–2674, ago. 2012.

WAN MAHMOOD, W. M. A. et al. Polyol-Based Deep Eutectic Solvents for Extraction of Natural Polyphenolic Antioxidants from *Chlorella vulgaris*. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 7, n. 5, p. 5018–5026, 2019.

XUE, Z. et al. Physicochemical and functional properties of extruded dietary fiber from mushroom *Lentinula edodes* residues. **Food Bioscience**, v. 32, p. 100452, 1 dez. 2019.

YADAV, A. et al. Densities and dynamic viscosities of (choline chloride + glycerol) deep eutectic solvent and its aqueous mixtures in the temperature range (283.15–363.15) K. **Fluid Phase Equilibria**, v. 367, p. 135–142, 15 abr. 2014.

YAKHLEF, W. et al. Phenolic composition and antimicrobial activity of Algerian olive products and by-products. **LWT**, v. 93, p. 323–328, 1 jul. 2018.

YANG, J.; TAN, J. N.; GU, Y. Lactic acid as an invaluable bio-based solvent for organic reactions. **Green Chemistry**, v. 14, n. 12, p. 3304–3317, 2012.

ZHANG, Q. et al. Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 21, p. 7108–7146, 2012.

ZHANG, Q. W.; LIN, L. G.; YE, W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. **Chinese Medicine (United Kingdom)**, v. 13, n. 1, p. 1–26, 2018.

ZHENG, X.-K. et al. Phenolic constituents from the root bark of *Morus alba* L. and their cardioprotective activity in vitro. **Phytochemistry**, v. 135, p. 128–134, 1 mar. 2017.

ZHONG, J. J.; XIAO, J. H. Secondary metabolites from higher fungi: discovery, bioactivity, and bioproduction. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 113, p. 79–150, 2009.

ZHOU, P. et al. Enhanced phenolic compounds extraction from *Morus alba* L. leaves by deep eutectic solvents combined with ultrasonic-assisted extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 120, p. 147–154, set. 2018.