

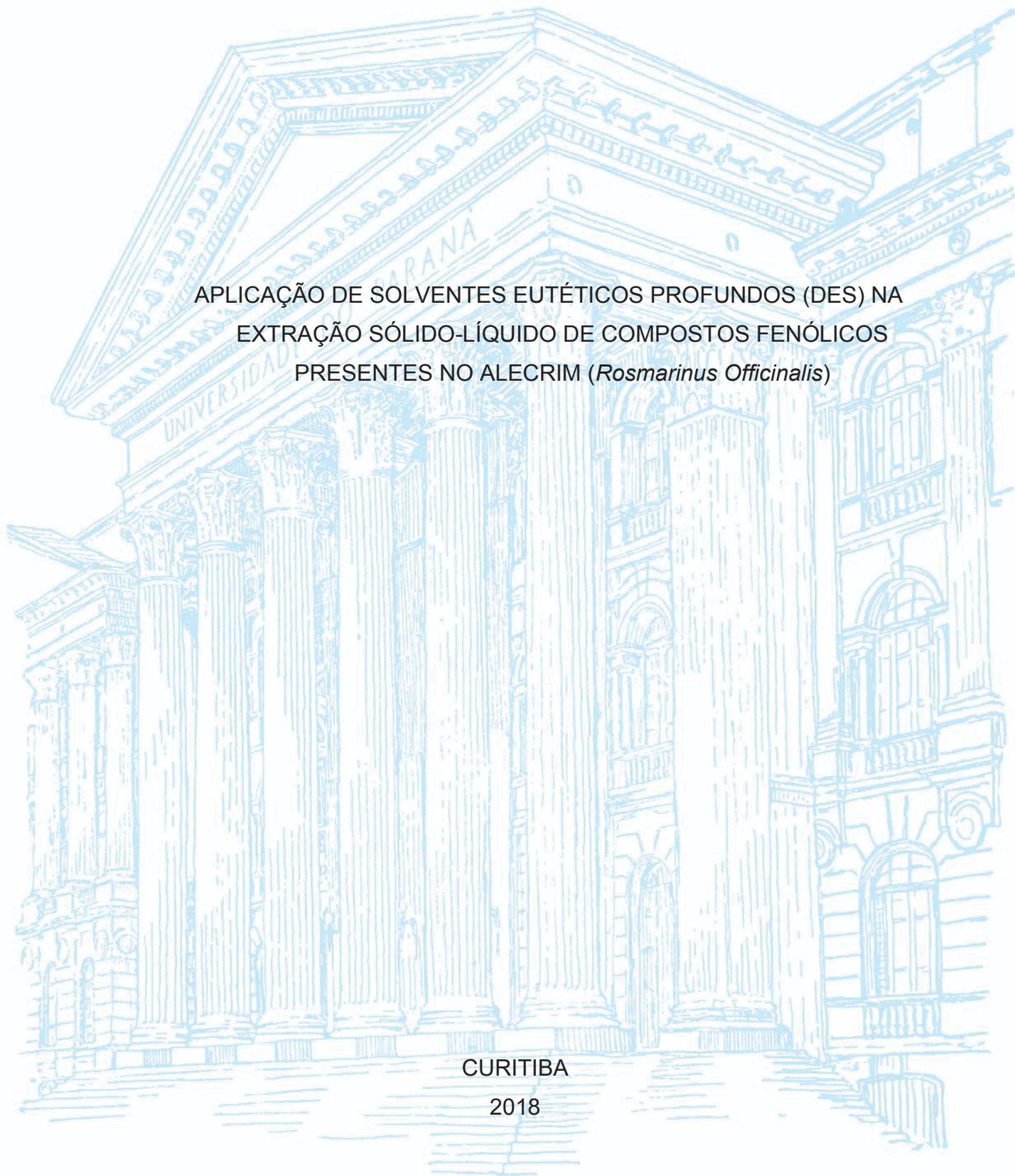
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JÚLIA BORTOLUZZI BARBIERI

APLICAÇÃO DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS (DES) NA
EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS
PRESENTES NO ALECRIM (*Rosmarinus Officinalis*)

CURITIBA

2018



JÚLIA BORTOLUZZI BARBIERI

APLICAÇÃO DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS (DES) NA
EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS
PRESENTES NO ALECRIM (*Rosmarinus Officinalis*)

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos R. Mafra
Co-orientadora: Aline T. Toci

CURITIBA

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE – SIBI/UFPR

B236a Barbieri, Júlia Bortoluzzi

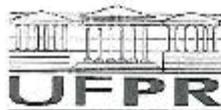
Aplicação de solventes eutéticos profundos (des) na extração sólido-líquido de compostos fenólicos presentes no alecrim (*Rosmarinus Officinalis*) [recurso eletrônico]/ Júlia Bortoluzzi Barbieri. Curitiba, 2020.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Marcos R. Mafra
Co-orientadora: Aline T. Toci

1. Engenharia de alimento. 2. Tecnologia em alimento. 3. Alecrim. I. Mafra, Marcos R. II. Toci, Aline T. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título. CDD 664

Bibliotecária: Vilma Machado CRB9/1563



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

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 JÚLIA BORTOLUZZI BARBIERI intitulada: *Aplicação de Solventes Eutéticos Profundos (DES) na Extração Sólido-Líquido de Compostos Fenólicos presentes no Alecrim (Rosmarinus Officinalis)*, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer de a 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 normas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 10 de Dezembro de 2018.

MARCOS ROGERIO MAFRA

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

MARIA LUCIA MASSON

Avaliador Interno (UFPR)

FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL

Avaliador Externo (UFPR)

RESUMO

Os solventes eutéticos profundos (DES) têm sido estudados como novos tipos de solventes, capazes de substituir os solventes orgânicos convencionais devido à sua baixa toxicidade e alta biodegradabilidade, além de poderem ser dimensionados de acordo com a aplicação desejada. Tais propriedades tornam os DES adequados para serem aplicados na área de alimentos, inclusive na extração de biomoléculas. O propósito deste trabalho foi investigar a extração de compostos fenólicos do *Rosmarinus officinalis* L, popularmente conhecido como alecrim, utilizando quatro diferentes DES à base de cloreto de colina (ChCl): CGH, cloreto de colina: glicerol (1:2 m/v) e água (10% da massa total); CALH, cloreto de colina: ácido láctico (1:3 m/v) e água (10% da massa total); CPH, cloreto de colina: 1,2-propanodiol (1:2 m/v) e água (10% da massa total) e CAO, cloreto de colina: ácido oxálico (1:1, m/v) e água (10% da massa total). Além dos DES, etanol 100% foi usado como solvente para fins de comparação. Em todos os processos extrativos foram quantificados os compostos fenólicos totais pela metodologia de Folin e Ciocalteu e a capacidade antioxidante por meio do método de sequestro de radicais - DPPH• e pelo método de redução do ferro – FRAP. Também foi analisada a cinética de degradação dos compostos antioxidantes, por meio da metodologia DPPH•. Os resultados revelaram que o solvente com a menor eficiência de extração e com o menor tempo de meia vida $t_{1/2}$ foi o etanol 100%. Além disso, o CGH apresentou menor quantidade de compostos fenólicos totais, apesar de apresentar maior capacidade de estabilizar os antioxidantes. A cinética de degradação dos compostos fenólicos estudados mostrou-se melhor representada pelo modelo de Weibull. Por fim, os compostos fenólicos serão identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O uso dos DES apresentou rendimento similar ou superior ao solvente orgânico etanol 100%, além de uma maior preservação da atividade antioxidante dos extratos obtidos, em razão de uma provável maior estabilidade provocada pelas ligações moleculares entre os DES e os compostos fenólicos.

Palavras chave: Solventes verdes. Capacidade antioxidante. Modelo de Weibull.

ABSTRACT

The deep eutectic solvents (DES) have been studied as new types of solvents capable of replacing conventional organic solvents due to their low toxicity and high biodegradability. They can be sized according to the desired application. Such properties make DES suitable for application in the food area, including the extraction of biomolecules. The purpose of this work was to investigate the extraction of phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis* L, popularly known as rosemary, using four different DES based on choline chloride (ChCl): CGH, choline chloride: glycerol (1:2 w/v) and water (10% of the total mass); CALH, choline chloride: lactic acid (1:3 w/v) and water (10% of the total mass); CPH cloreto de colina: 1,2-propanediol (1:2 w/v) and water (10% of the total mass) and CAOH, choline chloride: oxalic acid (1: 1, w/v) and water (10 % of the total mass). In addition to DES, ethanol (100%) was used as solvent for comparison purposes. In all the extractive processes, the total phenolic compounds were quantified by the Folin & Ciocalteu methodology and the antioxidant capacity by means of the radical sequestration method - DPPH • and by the iron reduction method - FRAP•. The degradation kinetics of the antioxidant compounds were also analyzed using the DPPH • methodology. The results showed that the solvent with the lowest extraction efficiency and the shortest half-life $t_{1/2}$ was ethanol 100%. In addition, the CGH presented lower total phenolic compounds, despite having a higher capacity to stabilize the antioxidants. The degradation kinetics of the studied phenolic compounds were better represented by the Weibull model. Finally, the phenolic compounds will be identified and quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). The use of DES presented similar or superior yield to the organic solvent ethanol 100%. Besides a greater preservation of the antioxidant activity of the obtained extracts, due to a probable greater stability caused by the molecular connections between the DES and the phenolic compounds.

Key words: Green solvents. Antioxidant capacity. Weibull model.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	9
2.	OBJETIVOS	11
2.1.	OBJETIVO GERAL	11
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1	ASPECTOS GERAIS SOBRE A ESPÉCIE <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	13
3.1.1	Composição Química	14
3.1.2	Atividade Antioxidante	15
3.2	EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	18
3.3	EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO UTILIZANDO SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS (DES).....	22
3.4	EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DE ÁCIDOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES UTILIZANDO DES.....	26
3.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE O ESTADO DA ARTE.....	27
4.	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	MATERIAL.....	30
4.2	MÉTODOS.....	32
4.2.1	Preparo da Matéria Prima	32
4.2.2	Determinação do diâmetro médio das partículas	33
4.2.3	Determinação da umidade	34
4.2.4	Determinação das cinzas totais	34
4.2.5	Determinação do teor de lipídeos	34
4.2.6	Síntese dos solventes eutéticos profundos (DES)	35
4.2.7	Extração dos Compostos fenólicos totais	36
4.2.8	Determinação do teor de fenólicos totais por Folling Ciocalteau (TFC) 38	
4.2.9	Determinação da capacidade antioxidante	39
4.2.10	Análise HPLC	41
4.2.11	Validação do método de HPLC proposto	42
4.2.12	Determinação da cinética de degradação dos extratos	43
4.2.13	Análise estatística dos dados	45

5.	RESULTADOS	45
6.	CONCLUSÃO.....	60
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	62
	REFERÊNCIAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos estão presentes em quase todas as plantas como metabólicos secundários, os quais possuem importante função no processo de desenvolvimento, reprodução e proteção contra predadores e agentes patogênicos. Os compostos fenólicos são caracterizados por possuírem um ou mais anéis aromáticos e grupos hidroxila em suas estruturas.

Estas substâncias vêm sendo estudadas desde que se verificou as suas capacidades de auxiliar na prevenção de várias doenças, devido as suas propriedades anti-inflamatória, antivirais, analgésica, anticarcinogênica e antioxidante. Na indústria alimentícia os compostos fenólicos são empregados na preservação de alimentos e como alternativa para os consumidores que buscam por produtos alimentares naturais, preocupando-se com a resistência microbiana e o uso de substâncias sintéticas como conservantes.

Os compostos fenólicos estão concentrados em quase todo o Reino *Plantae* e um dos primeiros e mais crítico passo para a obtenção destes é o processo de extração. A técnica mais utilizada é a extração sólido-líquido onde são empregados comumente solventes orgânicos, como acetona, acetato de etila, metanol, etanol e propanol.

Embora possam apresentar elevados rendimentos, os solventes orgânicos apresentam diversas desvantagens. Além de não serem biodegradáveis, estes solventes tendem a se acumular na atmosfera em razão das suas baixas pressões de vapor. Além disso, em geral são inflamáveis, o que aumenta os riscos operacionais.

A busca atual pelo desenvolvimento sustentável tem levado a comunidade científica e o setor produtivo a investigar e implementar novos solventes. Fluidos supercríticos, como CO₂ supercrítico, podem ser uma alternativa. Entretanto, a técnica exige um alto custo quanto aos equipamentos necessários para obtenção das condições supercríticas.

Os solventes derivados de biomassa, tais como etanol, limoneno, lactato de etila ou glicerol também podem ser utilizados como alternativa ambientalmente segura aos solventes orgânicos em razão do seu caráter bio-renovável e inócuo,

além de em geral não apresentarem elevado custo de produção. Entretanto, a capacidade de solubilização destes solventes é bastante restrita.

Os líquidos iônicos (LI's) constituíram a primeira geração dos solventes verdes sintéticos. Os LI's consistem da associação entre um cátion orgânico e um ânion, sendo caracterizados por possuírem baixa pressão de vapor, baixa inflamabilidade e estabilidade em altas temperaturas. Os LI's podem ser sintetizados de forma a terem as suas características físico-químicas aptas as mais diversas aplicações, sendo caracterizados como solventes passíveis de dimensionamento (*solvent design*). Mesmo apresentando diversas características positivas, os LI's têm o seu emprego dificultado em razão de possuírem um alto custo de produção, síntese complexa, alta toxicidade e baixa biodegradabilidade.

Os solventes eutéticos profundos (DES's) vêm sendo aplicados como alternativa a diversos outros solventes. Os DES's são identificados como sendo uma mistura entre um sal ou acceptor de hidrogênio (HBA) e um doador de hidrogênio (HBD). Os DES's compartilham de muitas propriedades dos LI's com a vantagem de possuírem baixo custo, serem inertes quimicamente e de fácil preparação. Além disso, dependendo dos precursores (HBA e HBD) empregados na sua síntese, os DES's podem ser biodegradáveis e não tóxicos.

Em razão das fortes ligações de hidrogênio que formam os DES's, ocorre um grande abaixamento na temperatura de fusão do complexo formado, tornando-os líquidos em temperaturas relativamente baixas.

O interesse dos DES's na extração de compostos fenólicos de plantas se deve à sua biocompatibilidade e também em razão da possibilidade de ocorrer uma maior estabilidade dos compostos fenólicos nesses solventes. Esse efeito decorre das interações moleculares entre o solvente (DES) e o composto fenólico, preservando dessa forma as características funcionais da biomolécula, como a capacidade antioxidante.

Frente a isso, este trabalho foi desenvolvido com o intuito de aplicar a tecnologia de ultrassom na extração de compostos fenólicos, utilizando para isso os solventes eutéticos profundos (DES), buscando otimizar o tempo de extração e a quantidade de solvente necessária. Para fins comparativos, em relação à eficiência de extração e capacidade antioxidante dos extratos, foram utilizados os DES e o solvente orgânico etanol 100%.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial extrativo e capacidade estabilizante dos solventes eutéticos profundos quanto aos compostos fenólicos presentes no alecrim.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar e sintetizar os solventes eutéticos profundos (DES), utilizando cloreto de colina como sal e os componentes glicerol, ácido oxálico, ácido láctico e 1,2-propanodiol como doadores de hidrogênio (HBD);
- Empregar os DES selecionados na etapa anterior na extração dos compostos fenólicos presentes no alecrim;
 - Avaliar o tempo de extração;
 - Avaliar a relação massa-volume de soluto e solvente;
 - Comparar os resultados obtidos utilizando os DES como solvente em relação aos resultados obtidos utilizando etanol 100% como solvente convencional.
- Quantificar os compostos fenólicos totais dos extratos por meio da metodologia de Folin Ciocalteu;
- Avaliar a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos por meio do método de sequestro de radicais - DPPH• e método de redução do ferro - FRAP;
- Avaliar a estabilidade da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos em diferentes períodos de tempo, por meio da metodologia DPPH• com posterior modelagem cinética utilizando o modelo cinético de primeira ordem e o modelo empírico de Weibull;

- Identificar os compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na revisão bibliográfica apresentada neste tópico serão abordados os aspectos básicos acerca do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), matéria prima utilizada no trabalho. Além disso, será realizada uma breve descrição dos principais compostos da espécie, com uma caracterização mais detalhada dos compostos fenólicos que serão avaliados. Serão apresentados os principais aspectos avaliados durante o processo de extração sólido-líquido e as principais características dos solventes eutéticos profundos (DES's) e a sua aplicação em processos de extração de biomoléculas, destacando os compostos fenólicos.

3.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE A ESPÉCIE *ROSMARINUS OFFICINALIS* L.

A espécie *Rosmarinus Officinalis*, popularmente conhecida como alecrim, é caracterizada como um arbusto ramificado, com folhas verdes pequenas, que pode atingir cerca de um metro com hastes verticais. Suas folhas possuem pequenas glândulas que contêm óleos aromáticos. A espécie nativa cresce ao longo das costas norte e sul do mar Mediterrâneo, porém é cultivada em quase todos os países de clima temperado. (LORENZI, H.; MATOS, F., 2006).

O alecrim foi aclimatado no Brasil e hoje em dia existem mais de 10 variedades em cultivo, sendo todas com o uso principalmente voltado para aplicações culinárias e medicinais, porém com aromas e características levemente diferentes. (PENTEADO; CECY, 2006).

3.1.1 Composição química

O extrato obtido de unidades dessecadas contém entre 10 a 15 mL/kg de um óleo essencial, cujos componentes principais são o alcanfor, 1-8 cineol, alfa-pineno, borneol e canfeno em proporções variáveis, as quais dependem da origem e das condições de cultivo da planta. (BRUNETON, J., 2011).

Os compostos fenólicos estão presentes na maioria das plantas como metabólicos secundários, exercendo um importante papel no processo de crescimento e reprodução, ou promovendo proteção contra agentes patogênicos e predadores. Estes compostos são muito empregados em alimentos e cosméticos, devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes. (RUESGAS-RAMON et al., 2017).

Os compostos fenólicos do alecrim se encontram representados por flavonoides e por ácidos fenólicos, os quais são na maioria derivados cafeicos: ácido cafeico, ácido clorogênico e ácido rosmarínico. A planta também caracteriza-se pela presença de diterpenos tricíclicos, tais como: ácido carnosólico, carnosol (majoritários); rosmanol; epirosmanol; isorosmanol; rosmarinidifenol; rosmariniquinona; rosmadiol; etc. (Tabela 1)

Na Tabela 1 estão apresentados os constituintes fenólicos encontrados em extratos de alecrim em diferentes estudos e obtidos por diferentes técnicas de extração.

TABELA 1 - COMPOSTOS FENÓLICOS ENCONTRADOS NO ALECRIM.

Constituintes encontrados	Método de extração	Referência
Ácido Carnósico, Carnosol, Rosmadiol, Metil Carnosato	Extração por Soxhlet	BICCHI, C.; BINELLO, A.; RUBIOLO, P., (2000)
Ácido Carnósico, Carnosol	Extrato comercial obtido para análise	THORSEN, M. A.; HILDEBRANDT, K. S., (2003)
Ácido Rosmarínico, Epirosmanol, Ácido Carnósico, Carnosol	Extração líquido-líquido utilizando ultrassom	MULINACCI, N. ET AL., (2011)
Ácido Carnósico, Carnosol, Ácido Rosmarínico	Extração com solvente convencional	DEL BAÑO, M. ET AL., (2003)

FONTE: A autora (2018).

3.1.2 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos de alecrim foi evidenciada pela aplicação em diversos produtos alimentícios, como em lipídeos e carnes. Essa

característica se deve à presença de diterpenos fenólicos, sendo classificados como os mais abundantes o ácido carnósico e o carnosol. Outros diterpenos fenólicos, como o rosmanol e epirosmanol, estão presentes em menores concentrações. (THORSEN; HILDEBRANDT, 2003).

Cuvelier et al. (1996) analisaram a composição e a atividade antioxidante de 24 diferentes extratos de alecrim. Vinte e sete compostos foram detectados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e vinte e dois foram identificados. Identificou-se que os compostos do tipo ácidos fenólicos que mais contribuem para a atividade antioxidante do extrato são o ácido rosmarínico, o ácido carnosol e o carnósico, os quais estavam presentes em concentrações elevadas em todas as amostras analisadas. (MARIUTTI BRAGAGNOLO, 2007).

A Figura 1 mostra a estrutura química dos principais compostos fenólicos encontradas nos extratos de alecrim.

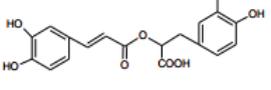
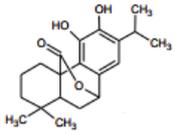
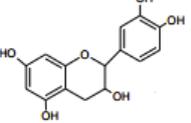
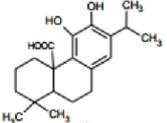
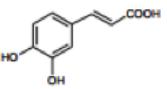
	Estrutura	Nome popular	Fórmula Molecular	PM
1		Ácido Rosmarínico	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	360,31 g/mol
2		Rosmanol	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	346,423 g/mol
3		Catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,24 g/mol
4		Ácido Carnósico	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	332,44 g/mol
5		Ácido Cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	180,16 g/mol

FIGURA 1. ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS ENCONTRADOS NO ALECRIM.
FONTE: ADAPTADO DE MEDEIROS (2013).

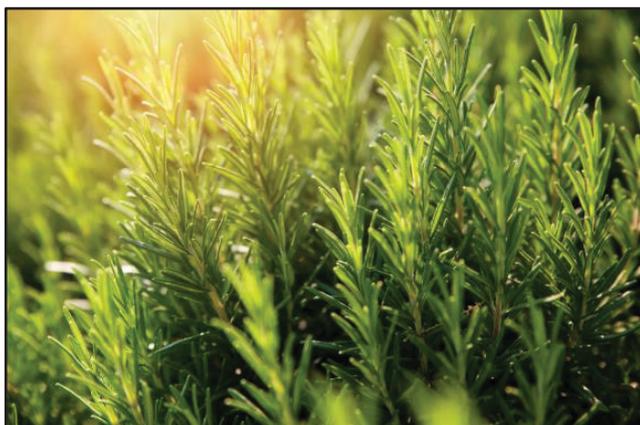


FIGURA 2 – *Rosmarinus Officinalis L.* MAIS CONHECIDO COMO ALECRIM.
FONTE: Revista Sociedade da Mesa, 2018.

A qualidade do antioxidante e, conseqüentemente, o preço comercial do extrato de alecrim dependem primeiramente da quantidade de compostos antioxidantes, como ácido carnósico e ácido rosmarínico, por exemplo, presentes no extrato. Por essa razão, a determinação quantitativa exata dos extratos finais é de grande importância, possuindo um amplo interesse comercial para a indústria alimentícia, por serem um potente antioxidante natural. (THORSEN; HILDEBRANDT, 2003).

Frente a isso, a planta tem sido estudada com frequência nos últimos anos por apresentar uma grande quantidade de antioxidantes potentes. O gráfico da Figura 3 apresenta os índices de publicações feitas à respeito do alecrim ao longo das décadas, enquanto no gráfico da Figura 4 é possível observar que o Brasil possui posição de destaque no número de publicações se tratando da espécie.

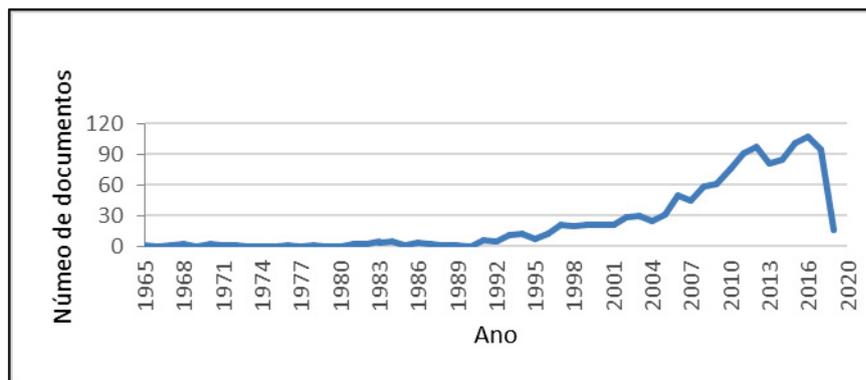


FIGURA 3 - NÚMERO DE DOCUMENTOS PUBLICADOS ANUALMENTE SOBRE A ESPÉCIE *Rosmarinus Officinalis L.* DESDE 1965.

FONTE: Base de pesquisa Scopus, 2018.

De acordo com a base de pesquisa Scopus, desde 1965, foram publicados cerca de 120 documentos envolvendo a espécie *Rosmarinus Officinalis L.*, sendo a maioria destes documentos publicados na forma de artigos científicos. Frente à estes trabalhos, como pode ser visualizado na Figura 4, o Brasil está na segunda posição no ranking de publicações mundiais, perdendo somente para a Espanha, país aonde a planta é nativa. Devido à grande importância e quantidade dos compostos antioxidantes presentes no alecrim, pesquisas a seu respeito são consideradas promissoras.

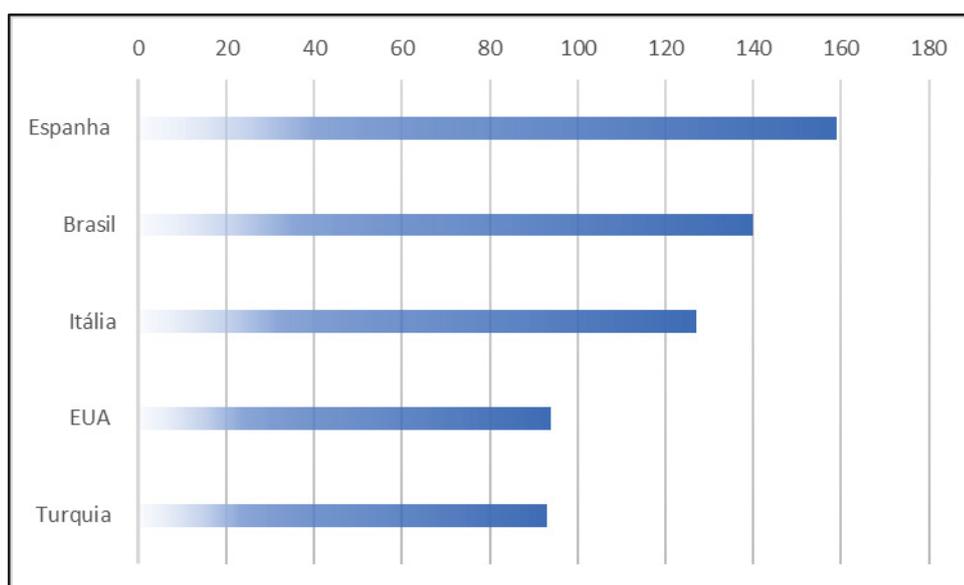


FIGURA 4 - POSICIONAMENTO DO BRASIL FRENTE AO NÚMERO DE PUBLICAÇÕES REFERENTES À ESPÉCIE *Rosmarinus Officinalis L.*

FONTE: Base de pesquisa Scopus, 2018.

Vale ressaltar que a base *Scopus* é referência da Editora Elsevier e desde 1823 indexa títulos acadêmicos, títulos de acesso livre, páginas web de conteúdo científico, anais de conferência, livros, etc. Desta forma, os dados apresentados nas Figura 3 e Figura 4 podem ser considerados como um panorama geral do assunto.

3.2 EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

O processo de extração é explorado desde os primórdios. Antigos povos, a exemplo os fenícios, judeus, árabes, índios, etc., empregavam processos de extração tais como maceração, destilação, entre outros, para a fabricação de alimentos, principalmente bebidas; produtos cosméticos e farmacêuticos e até mesmo biocombustíveis. Atualmente, na indústria alimentícia, alguns processos extrativos já são bem explorados e estabelecidos, como exemplo os processos de extração de açúcar da beterraba ou de cana-de-açúcar, preparação de chás e café descafeinado. (CHEMAT; VIAN; CRAVOTTO, 2012).

A extração de uma matriz utilizando solventes, ou extração sólido-líquido, é o processo mais comum aplicado na obtenção de extratos com alta atividade antioxidante (ANWAR, et. al). A extração sólido-líquido é um processo de separação que envolve a transferência de solutos de uma matriz sólida para um solvente. Durante esse processo, a concentração de soluto no interior do sólido varia, caracterizando um estado não-estacionário ou instável. Uma série de fenômenos ocorrem durante o período de interação entre a matriz, que contém os solutos de interesse e o solvente que efetua a separação. (AGUILERA, 2003). As etapas envolvidas estão representadas esquematicamente na Figura 5.

1. Entrada do solvente na matriz sólida.
2. Solubilização e/ou fracionamento de componentes.
3. Transporte de soluto para o exterior da matriz sólida.
4. Migração do soluto extraído desde a superfície externa do sólido para a solução.

5. Movimento do extrato (solvente mais soluto) em relação ao sólido.
6. Separação e descarga do extrato e sólidos.



Figura 5. PRINCIPAIS ETAPAS DA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO.
 FONTE: Adaptado de AGUILERA (2003).

A eficiência da extração de compostos antioxidantes de plantas é influenciada principalmente pelas condições do processo de extração sólido-líquido e pela seleção do solvente apropriado. (PINELO et al., 2006). O resultado da extração é função do quão rápido o componente de interesse se dissolve no solvente e o equilíbrio é alcançado.

Apesar da eficiência do processo possa ser melhorada com temperaturas crescentes, a instabilidade dos fenóis e a sua possível degradação não permitem um aumento indefinido desta variável. (MAZZA; MINIATI, 1993). Diversos trabalhos avaliaram 50°C como a temperatura ideal para a extração de compostos fenólicos de diferentes fontes naturais. (PINELO et al., 2006). Outras variáveis como tamanho de partícula e quantidade de amostra também foram relatadas como afetando a eficiência do processo de extração. (PINELO et al., 2006).

O emprego da sonicação em processos de extração sólido-líquido vem sendo empregadas para auxiliar os processos, de forma a aumentar o rendimento destes e diminuir o tempo de processamento. Ultrassons são ondas mecânicas com frequência maior que 20 kHz que se propagam através de qualquer meio material. (KORN, M.; PEREIRA, M. G.; BORGES, S. S., 2005).

A principal explicação para os efeitos provocados pelas ondas ultrassônicas em sistemas químicos se dá pela cavitação. Na cavitação há formação, crescimento e colapso de bolhas micrométricas e assim ocorre a liberação de grande quantidade de energia para o meio, proporcionando um aumento na temperatura e na pressão, o que leva ao aumento da eficiência do processo. (KORN, M.; PEREIRA, M. G.; BORGES, S. S., 2005).

Na extração sólido-líquido o processo é favorecido devido a lixiviação na superfície, erosão, fragmentação e aumento da área superficial das partículas sólidas promovidas pela sonicação. A redução no tamanho das partículas é um dos maiores benefícios, visto que muitas reações são limitadas pela área superficial exposta aos reagentes. (KRUG, F. J., 2003).

O aumento da área superficial é provocado pelo colapso das microbolhas nos poros dos sólidos ou pelos violentos choques entre as partículas. Além disso, as bolhas formadas nas proximidades das partículas tornam-se assimétricas e ao implodirem originam microjatos de líquidos que resultam na erosão e, conseqüentemente, na renovação da superfície, melhorando a interação entre solvente e amostra. (SUSLICK K. S., 1990).

Como visto, a extração de antioxidantes não deve ser realizada em temperaturas elevadas, uma vez que estes se degradam facilmente nessas condições, perdendo suas propriedades funcionais. Sendo assim, o ultrassom proporciona a capacidade de extrair de maneira eficiente em temperaturas inferiores às usadas convencionalmente. (PANIWNYK et al., 2009).

Albu et al., (2004) investigaram o efeito de diferentes solventes e a influência do ultrassom na extração do ácido carnósico do alecrim. O uso convencional do etanol, sem a aplicação da técnica de ultrassom, foi significativamente menos efetivo do que o uso do acetato de etila e da butanona. A aplicação do ultrassom melhorou o desempenho do etanol como solvente, de modo que o seu rendimento pôde ser comparado aos dos demais solventes avaliados.

Hui, Etsuzo e Masao (1994), avaliaram o efeito do ultrassom na extração da saponina do ginseng. A extração da saponina se mostrou como função do tempo de irradiação e da pressão do ultrassom. Observou-se que a sonicação

aumentou o rendimento total da extração em 15%, sendo que para a saponina o aumento no rendimento foi de 30%.

Primo et al. (1973), mostraram a importância do ultrassom na melhoria da coloração e da viscosidade do suco de laranja. Annegowda et al. (2012), examinaram a eficiência da sonificação na extração de compostos fenólicos e outros compostos antioxidantes da carambola. Os resultados do estudo indicaram que o tratamento com ultrassom aumentou a eficiência da extração.

A utilização do ultrassom tem como principais efeitos positivos a alta eficiência e a redução no tempo de extração, possibilitando a redução na quantidade de solvente utilizada e no consumo de energia, bem como temperaturas inferiores as necessárias em outras técnicas. (TABARAKI; NATEGHI, 2011). Perante tantas qualidades, esta tecnologia pode ser considerada capaz de alcançar o objetivo de química sustentável.

Aguilera (2003) explicita que a seleção do solvente de extração se dá por uma série de propriedades:

1. Solubilidade do composto de interesse (ou compostos) no solvente.
2. Recuperação, uma vez que o solvente será reutilizado em extrações subsequentes.
3. Tensão interfacial e viscosidade. O solvente deve ser capaz de envolver e penetrar através dos poros da matriz sólida e sua viscosidade deve ser suficientemente baixa para que possa fluir facilmente.
4. Idealmente, o solvente deve ser não tóxico, estável, não reativo, não inflamável, inofensivo para o meio ambiente e barato.

As leis relativas ao uso dos solventes de extração em alimentos são elaboradas pensando na saúde humana. Os solventes convencionais aceitos para uso, e que estão em conformidade com as boas práticas de fabricação (GMP), são propano, butano, acetato de propila, acetato de etila, etanol, dióxido de carbono, acetona e dióxido nitroso (AGUILERA et. al., 2003).

Annegowda et. al, (2012) avaliaram a extração dos compostos fenólicos e outros antioxidantes presentes nos frutos de carambola usando como solventes convencionais o metanol e a água. Como resultados, a extração com metanol

exibiu um rendimento de extração superior, sendo ainda observado que o extrato obtido possuía uma maior capacidade antioxidante.

Pinelo et al., (2006) realizaram um estudo sob as condições que maximizam o rendimento na extração dos compostos fenólicos e a capacidade antioxidante dos frutos de uva. A otimização foi realizada por metodologia de superfície de resposta, usando etanol como solvente e 50 °C como temperatura de extração. Três variáveis foram consideradas críticas, sendo essas: a vazão do solvente, a quantidade de amostra analisada e o tamanho da partícula.

Rockenbach et al., (2007) analisaram a influência de diferentes solventes no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva variedades *Tannat* e *Anceleta*. O conteúdo de compostos fenólicos totais em acetona 50 e 70% foram maiores nas duas variedades, enquanto que o conteúdo de antocianinas totais extraídos em ambas as variedades foram maiores no solvente etanol em concentrações de 50 e 70%. Pelo método ABTS, a atividade antioxidante foi maior nas concentrações de 50 e 70% de acetona para a variedade *Tannat* e 50 e 70% de acetona e etanol para a variedade *Anceleta*. Em relação ao poder redutor pelo método FRAP, este foi maior em solvente acetona 70% para as duas variedades. No ensaio do poder de inibição da oxidação, a adição de 100 e 200 µL de extratos etanólicos a 50% das variedades *Tannat* e *Anceleta* apresentou maior eficiência, sendo quase duas vezes superior aos extratos acetônicos testados

3.3 EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO UTILIZANDO SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS (DES)

A extração sólido-líquido utilizando solventes alcoólicos, como butanol; etanol; isopropanol - puros ou em solução aquosa - é uma das operações mais utilizada na indústria de alimentos. As moléculas obtidas podem ser empregadas como aditivo em alimentos, a fim de promover o seu enriquecimento nutricional. (PINELO et al., 2006). Entretanto, como a maior parte dos extratos são utilizados em produtos alimentícios, farmacêuticos e medicinais, existe uma grande restrição ao uso de solventes orgânicos, devido a sua toxicidade. Desta forma, tem-se procurado novas alternativas envolvendo os chamados “solventes verdes”.

Devido a toxicidade, os extratos obtidos por solventes orgânicos exigem um controle de qualidade especial nas indústrias de alimentos e farmacêutica. Além disso, muitas vezes esses solventes são inflamáveis, explosivos ou pouco biodegradáveis. Os solventes eutéticos profundos (DES) surgiram no contexto da química verde em razão da sua biodegradabilidade, baixa ou nenhuma toxicidade, fácil síntese e baixo custo. Ao mesmo tempo, os DES podem ser sintetizados com propriedades físico-químicas distintas, enquadrando-o no conceito de “*solvent design*” (solvente que pode ser dimensionado), permitindo que os DES possam ser desenvolvidos para as mais diversas aplicações e sistemas. (DAI, 2013).

Os DES's foram descritos pela primeira vez por Abbott et al., (2003), como sendo uma mistura de sais quaternários de haletos orgânicos, composto por um receptor de hidrogênio (HBA, do inglês *hydrogen bond acceptor*) e um composto orgânico doador de hidrogênio (HBD, do inglês *hydrogen bond donator*), como amidas, aminas, álcoois e ácidos. Em razão das fortes ligações de hidrogênio presentes nessa solução ocorre a formação de uma mistura eutética. (LIU et al., 2008).

As principais características do diagrama de fase (equilíbrio sólido-líquido) para uma mistura binária entre um sal quaternário (HBA) e um doador de hidrogênio (HBD) de um solvente eutético profundo (DES) estão descritas na Figura 6. Deve-se notar que a composição eutética é um valor único e corresponde à temperatura mínima de fusão no diagrama de fase. O ponto de fusão dos DES's muito baixo em relação aos seus componentes é a sua propriedade mais relevante. Este decaimento no ponto de fusão após a mistura se deve ao desenvolvimento de fortes interações moleculares entre o doador e o receptor de hidrogênio. (GARCÍA et al., 2015).

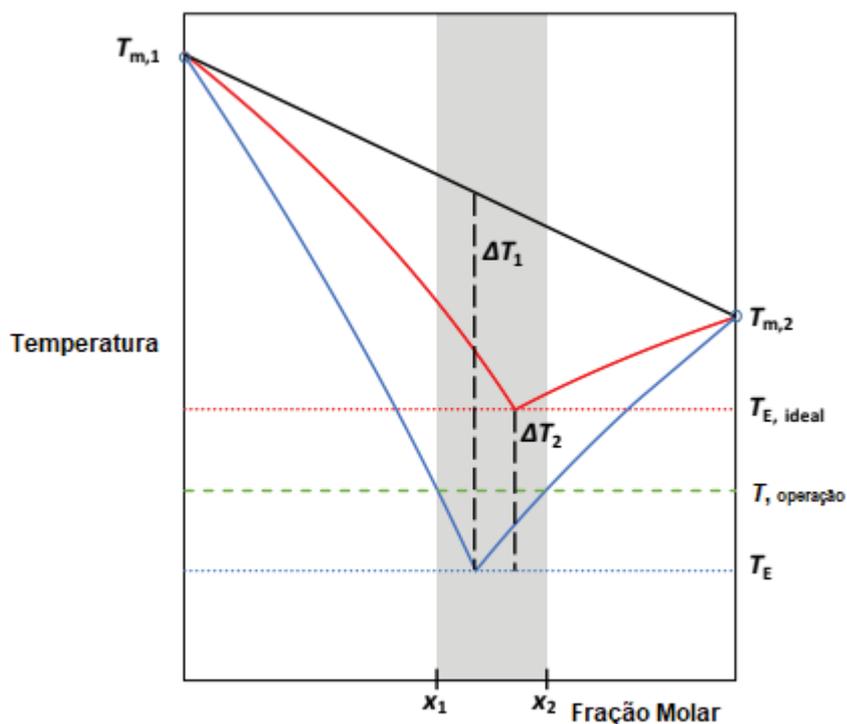


Figura 6. ESQUEMA DE UM DIAGRAMA DE FASE PARA UMA MISTURA BINÁRIA SÓLIDO-LÍQUIDO ENTRE UM SAL E UM HBD, MOSTRANDO A FORMAÇÃO DO DES. FONTE: Adaptado de MARTINS et al. (2018).

Um dos componentes receptores de hidrogênio mais comumente utilizado para formação dos DES é o cloreto de colina (ChCl), um sal de amônio quaternário atóxico (YADAV et al., 2014). Este sal é considerado um componente essencial para a dieta e funcionamento normal de todas as células, auxiliando em diversos mecanismos metabólicos. (FU et al., 2017; ZEISEL; BLUSZTAJN, 1994). O cátion colina foi recentemente aprovado sem limite máximo, pelo Conselho Diretivo 70/524/CEE, para utilização como aditivo nutricional, podendo ser incorporado em alimentos para animais e humanos (FEEDAP, 2011; HAMMOND; BOWRON; EDLER, 2016; YADAV et al., 2014).

García et al. (2015) discutem que a maioria dos estudos disponíveis consideram os DES formados pela mistura de cloreto de colina (ChCl) como aceptor de hidrogênio e três tipos principais de compostos como doadores de hidrogênio: compostos nitrogenados como aminas e amidas, álcoois e ácidos carboxílicos. Os autores ainda relatam que os pontos de fusão mais baixos

alcançados para os DES formados foram obtidos a partir dos polióis, como glicerol e etileno glicol.

Ruesgas-Ramon et al., (2017) citam que os solventes eutéticos profundos (DES) mais comuns são os formados pela mistura de cloreto de colina como acceptor de hidrogênio (HBA) e ureia, etileno glicol ou glicerol como doadores de hidrogênio (HBD). Maugeri e Domínguez (2011), mostram que estudos recentes reportam que a mistura de ChCl com glicerol tende a diminuir a viscosidade e a densidade, evidenciando ainda que uma simples mistura binária de compostos pode formar um DES. Um dos primeiros trabalhos realizado por Abbott et al., (2007) relata a síntese do DES à base de cloreto de colina (ChCl) e glicerol. A mistura foi formada por aquecimento do sal (ChCl) com o HBD (glicerol) a 50°C até a formação de um líquido incolor e homogêneo.

Em 2010, Hayyan et al. utilizaram no preparo do DES cloreto de colina e glicerol. Primeiramente o sal (ChCl) foi seco sob vácuo e então misturado ao glicerol em diferentes razões molares ChCl:glicerol (1:1, 1:1,25, 1:1,5, 1:2 e 1:3). A mistura foi agitada a 50°C durante 1 hora até a formação do líquido incolor e homogêneo. Também em 2010, Shahbaz et al. realizaram a síntese do DES utilizando cloreto de colina como sal e etileno glicol. O ChCl também foi seco sob vácuo e em seguida foi misturado com o etileno glicol em diferentes razões molares ChCl:etileno glicol (1:1,75, 1:2, 1:2,25 e 1:2,5). A mistura foi agitada na temperatura de 60°C até a formação do líquido incolor e homogêneo.

Existem dois métodos mais utilizados na síntese dos DES: por aquecimento e por evaporação. No método por aquecimento, os constituintes são aquecidos em torno de 50 °C sob branda agitação. Já no método de evaporação, os componentes da mistura são dissolvidos em água, aquecidos até 60 °C, sob branda agitação e após a formação do DES a água é removida por evaporação à vácuo. Porém, haja vista que os componentes podem ser ligeiramente instáveis, o método de aquecimento é, em geral, o mais utilizado (DAI, 2013).

Sabe-se que a viscosidade é um parâmetro muito importante quando se considera um solvente para extração devido a sua influência na transferência de massa, no processamento e transporte. A alta viscosidade dos DES, muito maior do que a apresentada pelos solventes convencionais, se deve à presença de uma extensa rede de ligações de hidrogênio. Entretanto, a viscosidade dos DES pode

ser reduzida por meio do aumento da temperatura ou pela adição de água até no máximo 10% (v/v) (DAI et al., 2014; RUEGAS-RAMON et al., 2017).

3.4 EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DE ÁCIDOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES UTILIZANDO DES

Xiu et al., (2015) analisaram a extração do ácido rosmarínico e salviaflaside da brunéla – *Prunella vulgaris L* empregando DES como solventes. A extração foi realizada com seis diferentes DES constituídos de álcoois, com diferentes razões molares. A maior eficiência foi alcançada com a mistura ChCl:etileno glicol, com uma razão molar de 1:4. Além disso, notou-se que com um aumento na concentração do HBD (etileno glicol) houve um decréscimo significativo na taxa de extração de compostos fenólicos. Isso foi explicado devido à dificuldade da extração em consequência da alta viscosidade da mistura. A adição de água se mostrou uma boa alternativa para diminuir a viscosidade e aumentar a eficiência da extração.

Outros autores, conforme apresentado na Tabela 2, avaliaram a extração de ácidos fenólicos de diferentes plantas, utilizando diferentes misturas de DES.

TABELA 2. ÁCIDOS FENÓLICOS EXTRAÍDOS POR DIFERENTES DES EM DIFERENTES MATRIZES.

Ácidos Fenólicos	Plantas	DES com melhor resultado	Referência
5-CQA, CA, 3,5-DCQA, 3,4-DCQA e 4,5-DCQA	<i>Lonicera japonica</i>	ChCl/ácido oxálico e ChCl/ácido láctico	PENG et al., (2016)
5-CQA e CA	<i>Herba artemisiae scopariae</i>	Cloreto de tetrametil amônio/uréia	PARK et al., (2014)
RA	<i>Prunella vulgaris L.</i>	ChCl/etileno glicol	XIU et al., (2015)
SA, RA, LA	5 ervas medicinais chinesas	ChCl/ácido laevulínico e ChCl/acetamida	DUAN et al., (2016)

Onde: CA – ácido cafeico, RA – ácido rosmarínico, SA – ácido salvianólico, LA – ácido litospérmico, 5-CQA – ácido clorogênico, 3,5-DQCA – ácido 3,5 dicicailíquico, 3,4-DCQA – ácido 3,4 dicicailíquico, 4,5-DCQA – ácido 4,5 dicofamoiquinico.

FONTE: A autora, (2018).

Zhang et al., (2014) avaliaram a extração dos flavonoides catequina, galato de epigallocatequina e galato de epicatequina do chá verde empregando vários DES sintetizados à base de ChCl e álcoois. O estudo mostrou que mesmo com as limitações apresentadas pelos DES, como alta viscosidade e polaridade, a mistura ChCl:etileno glicol, 1:5 (base molar) mostrou uma alta eficiência, sendo essa maior do que a alcançada com metanol e água.

Em 2015, Li et al. investigaram a extração de galato de epigallocatequina, galato de epicatequina e epicatequina das folhas de *Camellia sinensis* por diferentes misturas de ChCl e HBD da família dos álcoois, ácidos orgânicos e sacarídeos. O estudo mostrou que a mistura com ácido láctico como HBD é um ótimo solvente para extração de catequinas, a qual apresentou uma alta eficiência de extração.

Outros autores, conforme a Tabela 3, avaliaram a extração de flavonoides de diferentes plantas, utilizando diferentes misturas de DES.

TABELA 3. FLAVONÓIDES EXTRAÍDOS POR DIFERENTES DES'S EM DIFERENTES MATRIZES.

Flavonoides	Plantas	DES com melhor resultado	Referência
CA, EGCG e ECG	Chá verde	ChCl/etileno glicol	ZHANG et al., (2014)
EGCG, ECG e EC	<i>Camellia sinensis</i>	ChCl/ácido láctico	LI et al., (2015)
CA	Casca de uva	ChCl/ácido oxálico	CVJETKO et al., (2016)

Onde: CA – ácido cafeico, EGCG – galato de epigallocatequina, ECG – galato de epicatequina, EC – epicatequina.

FONTE: A autora, (2018).

3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE O ESTADO DA ARTE

As informações apresentadas na revisão bibliográfica tiveram como objetivo descrever a contextualizar o estado da arte dos assuntos relatados durante este trabalho. Sendo que os tópicos abordaram desde as principais características da matriz em estudo, *Rosmarinus Officinalis* L. até as metodologias

envolvidas nos processos de extração da espécie, focando na aplicação dos solventes eutéticos profundos (DES).

Atualmente, cada vez é maior a importância de tecnologias limpas, com menor impacto ambiental. Frente a isso, a possível substituição dos solventes orgânicos convencionais vem crescendo com o surgimento de solventes com menor toxicidade e maior biocompatibilidade e biodegradabilidade. Essa necessidade vem da crescente busca dos consumidores por produtos mais saudáveis, que sejam isentos de componentes químicos e que além disso, sejam obtidos com o menor impacto ambiental possível.

Sendo assim, este trabalho buscou explorar a possibilidade do uso de solventes verdes, conhecidos como solventes eutéticos profundos, na substituição de solventes convencionais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Na Tabela 4 estão descritos os materiais utilizados na preparação dos solventes eutéticos profundos (DES), nos processos de extração, nas metodologias de avaliação da eficiência extrativa e capacidade antioxidante dos extratos finais obtidos e nas técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência utilizada para avaliar qualitativamente e quantitativamente os extratos. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Termodinâmica e Operações de Separação (LATOS) da Universidade Federal do Paraná e no laboratório do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza. Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de alto grau de pureza com o intuito de se obter uma grande confiabilidade nos resultados.

A matéria prima, alecrim, foi adquirida em um mercado local, localizado na cidade de Curitiba-PR. Foram utilizados 2 kg de alecrim em flocos da marca CONDBRAS – temperos e especiarias. De acordo com o fornecedor, a matéria-prima foi seca em uma temperatura de 55-65°C durante aproximadamente 8 horas.

TABELA 4 - NOME, FORNECEDOR E GRAU DE PUREZA DOS MATERIAIS UTILIZADOS NOS ENSAIOS.

Nome do reagente	Fornecedor	Grau de pureza (%)
Carbonato de Sódio	Êxodo (Hortolândia, SP, Brazil)	99,5
Acetato de Sódio Anidro	Dinâmica (Diadema, SP, Brazil)	99,3
Ácido Acético Glacial	J.T. Baker Chemical Company (Phillipsburg, New Jersey, USA)	-
Ácido Hidroclórico	Panreac (Barcelona, Spain)	-
Etanol	Panreac (Barcelona, Spain)	99,8
Ácido Oxálico	Panreac (Barcelona, Spain)	99,5
Metanol	Panreac (Barcelona, Spain)	99,8
Cloreto de Ferro	Jand Química Ind. (Jandira, SP, Brazil)	-
Cloreto de Colina	Alamar Tecno-Científica (Diadema, SP, Brazil)	-
Glicerol	Labsynth (Diadema, SP, Brazil)	99,5
Ácido Láctico	Neon (São Paulo, SP, Brazil)	-
1,2-propanodiol	Neon (São Paulo, SP, Brazil)	99,96
Ácido rosmarínico	Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA).	99,97
Rosmanol	Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA).	99,98
Ácido Cafeico	Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA).	99,97
Reagente fenólico - Folin-Ciocalteu	Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA).	-
6- hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)	Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA).	-
2,20-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH*)		-
2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine	Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA).	-

FONTE: A autora, (2018).

4.2 MÉTODOS

Visando avaliar a extração dos compostos fenólicos presentes no alecrim, bem como analisar e quantificar os extratos obtidos, algumas metodologias foram empregadas. A Figura 7 apresenta uma visão geral dos processos utilizados neste trabalho. O primeiro processo realizado foi a moagem e caracterização da matéria prima, folhas de alecrim; em seguida a matéria-prima pronta para uso foi armazenada à vácuo e condicionada sob refrigeração. Em seguida foi realizada a síntese dos solventes eutéticos profundos (DES), pelo método de aquecimento, os solventes foram armazenados em frascos âmbar sob refrigeração. Foram também realizadas as etapas de extração com os DES e o etanol, com sequência aos processos de quantificação e identificação dos extratos. Por fim, foi realizada a avaliação da cinética de degradação dos compostos antioxidantes. Cada etapa apresentada será descrita detalhadamente nas seções subsequentes.

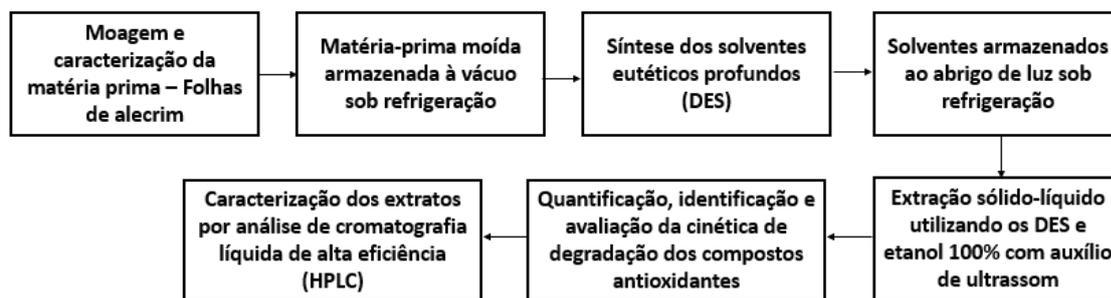


FIGURA 7 - FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA EXPERIMENTAL QUE SERÁ UTILIZADA NESTE TRABALHO.

FONTE: A autora (2018).

4.2.1 Preparo da matéria prima

Os flocos de alecrim secos foram triturados em um moinho de facas (Requival, MR 320, São Paulo, Brasil) no laboratório do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA) da Universidade Federal do Paraná.

Procedeu-se a classificação granulométrica utilizando peneiras da série Tyler (Bertel, ASTM). Em seguida o material foi embalado à vácuo e armazenado ao abrigo de luz em um refrigerador. Além disso, a composição físico-química das folhas de alecrim foi avaliada, conforme segue-se abaixo.

4.2.2 Determinação do diâmetro médio da partícula

O alecrim em pó foi classificado com o auxílio de peneiras da série Tyler (Bertel, Brasil), com as aberturas de 20, 28, 35, 48, 80, 100 e 150 mesh. Para a análise da granulometria utilizou-se um agitador mecânico (Bertel, Brasil), cujo reostato foi ajustado na posição 8 durante 15 minutos. O diâmetro médio das partículas foi determinado utilizando o cálculo proposto por Gomide (1983), Equação (1).

$$d_s = \sum \frac{\sum_1^n \frac{\Delta l_i}{d_i}}{\sum \frac{\Delta l_i}{d_i^3}} \quad (1)$$

Onde,

$$\Delta l_i = \frac{m_i}{M}$$

Em que d_s corresponde ao diâmetro médio superficial das partículas em cm; m_i corresponde à massa de amostra retida na peneira em g; M corresponde à massa total de amostra em g; d_i corresponde ao diâmetro médio da abertura da peneira em cm; n corresponde ao número total de frações.

A metodologia aplicada considerou a fração mássica do material moído nas séries de 28 a 150 mesh, como descrito na Tabela 5. A descrição da abertura em (cm) das peneiras utilizadas na determinação do diâmetro médio das partículas pode ser encontrado na Tabela 5.

TABELA 5 - DIÂMETRO DA ABERTURA DAS PENEIRAS UTILIZADAS NA DETERMINAÇÃO DO TAMANHO MÉDIO DAS PERTÍCULAS DO ALECRIM EM PÓ.

Tyler/Mesh	Abertura/di (cm)
20	0,085
28	0,08
35	0,0425
48	0,03
80	0,018
100	0,015
150	0,0106
fundo	fundo

FONTE: A autora, 2018.

4.2.3 Determinação da umidade

A análise para o teor de umidade do alecrim foi realizada com o auxílio de uma estufa de secagem sem circulação de ar. Foram pesados 5,0 g da amostra em cadinhos calcinados e previamente pesados. Os cadinhos, com a amostra de alecrim, foram dispostos em estufa a 105 °C até obtenção da massa constante (AOAC, 2005).

4.2.4 Determinação das cinzas totais

Após a análise da determinação de umidade, os cadinhos provenientes foram dispostos em uma mufla a 550 °C por 6 horas. Após este período, as amostras foram armazenadas em um dessecador até que resfriassem e posteriormente pudessem ser pesadas. O cálculo do teor de cinzas se deu pela diferença da massa inicial da amostra (AOAC, 2005).

4.2.5 Determinação do teor de lipídeos

O teor de lipídeos totais foi determinado pela extração com éter sob refluxo, em um aparelho de Soxhlet. Os recipientes foram armazenados em uma estufa a 105 °C para que fossem secos e posteriormente foram resfriados e então pesados (AOAC, 2005).

4.2.6 Síntese dos solventes eutéticos profundos (DES)

Os DES utilizados neste trabalho foram sintetizados pelo método de aquecimento descrito por DAI, (2013). Todos os DES foram sintetizados a partir do sal cloreto de colina (ChCl), o qual atuou como receptor de hidrogênio (HBA), e os álcoois, glicerol e 1,2-propanodiol, e ácidos, oxálico e láctico, como doadores de hidrogênio (HBD).

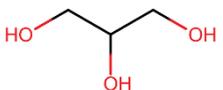
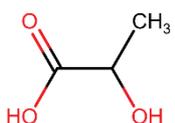
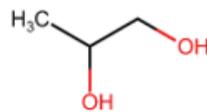
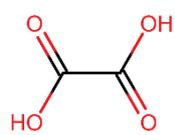
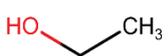
O procedimento experimental consistiu na secagem, pesagem e mistura dos reagentes nas proporções definidas, Tabela 6; seguido de agitação com aquecimento controlado e armazenamento.

Na preparação dos reagentes primeiramente pesou-se o sal receptor de hidrogênio (cloreto de colina) e em seguida o HBD, segundo razões molares previamente estabelecidas por referências, as quais podem ser verificadas na Tabela 6. Com o auxílio de um bastão de vidro realizou-se a pré-homogeneização dos reagentes.

Após a homogeneização, transferiu-se a mistura para uma banho-maria Dubnoff mantido na temperatura de 50 °C e à uma rotação de 220 rpm até a formação de um líquido transparente e homogêneo.

Após a formação do DES – líquido transparente e homogêneo – uma quantidade pré-estabelecida de água osmolizada, a qual corresponde a 10% da massa total da mistura de reagentes, foi adicionada. A mistura formada foi armazenada ao abrigo da luz (frascos âmbar) e da umidade ambiente (frascos armazenados em dessecador) a fim de evitar possíveis interferências.

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS (DES).

N°	HBD	Abreviação	ChCl: HBD (razão molar)*	Referência	
1		Glycerol	CGH	(1:2)	YADAV, A., et al. (2014)
2		Lactic Acid	CALH	(1:3)	BAKIRTZI, C., et al. (2016)
3		1,2-propanediol	CPH	(1:2)	DAI, Y. (2013)**
4		Oxalic acid	CAOH	(1:1)	BUBALO, M., C., et al. (2016)
5		Ethanol 100%	ETOH		

* 10% (v/v) de água foi adicionado após a formação do DES

** com algumas modificações

Onde: CGH – glicerol, cloreto de colina e água; CALH – ácido láctico, cloreto de colina e água; CPH – 1,2 propanodiol, cloreto de colina e água; CAOH – ácido oxálico, cloreto de colina e água.

FONTE: A Autora, 2018.

4.2.7 Extração dos compostos fenólicos totais

A escolha dos componentes para a síntese dos solventes eutéticos profundos (DES) (Tabela 6) deu-se a partir de uma análise prévia da literatura, bem como em razão de outros trabalhos do grupo. Afim de avaliar o desempenho

dos DES em relação aos solventes orgânicos convencionais, foi utilizado, além dos DES, o etanol (100%) como solvente de extração.

As condições de extração foram definidas em uma etapa prévia, conforme, onde os solventes CGH, CAOH e etanol 100% foram selecionados para as análises preliminares. A proporção ideal entre a massa de soluto (alecrim) e o volume de solvente (DES/etanol), 1:20 (m/v), foi obtida em trabalhos anteriores do grupo. As temperaturas de 25 °C, 40 °C e 60 °C e os tempos de 30 min, 120 min e 240 min foram testados individualmente e os resultados obtidos foram comparados.

A Figura 9 apresenta as etapas do processo de extração dos compostos antioxidantes do alecrim Para realização do processo, 150 mg de alecrim seco e moído foram pesadas e adicionadas a 2,85 mL do solvente (etanol ou DES), relação 1:20 (m/v), em tubos de ensaio. Com o intuito de melhorar o processo de transferência de massa, os tubos de ensaio foram imersos em um banho ultrassônico com temperatura controlada. A escolha e o controle da temperatura foram essenciais para diminuir a viscosidade da mistura e ao mesmo tempo não degradar os compostos fenólicos do alecrim. Além disso, a cada 30 minutos, a extração foi interrompida para que a mistura fosse homogeneizada com auxílio de um vórtex por aproximadamente 1 minuto afim de obter-se um melhor contato soluto-solvente.



FIGURA 8 - ILUSTRAÇÃO DO EQUIPAMENTO DE ULTRASSOM UTILIZADO NOS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO.
FONTE: A AUTORA, 2018.

Os extratos finais foram centrifugados utilizando uma microcentrífuga a 9500 rpm por 3 minutos e posteriormente filtrados com filtro de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,45 μm . Para evitar a degradação dos extratos, as caracterizações dos extratos foram realizadas imediatamente após o processo de extração, sendo que nenhum extrato foi armazenado por um período de tempo maior que 10 horas.

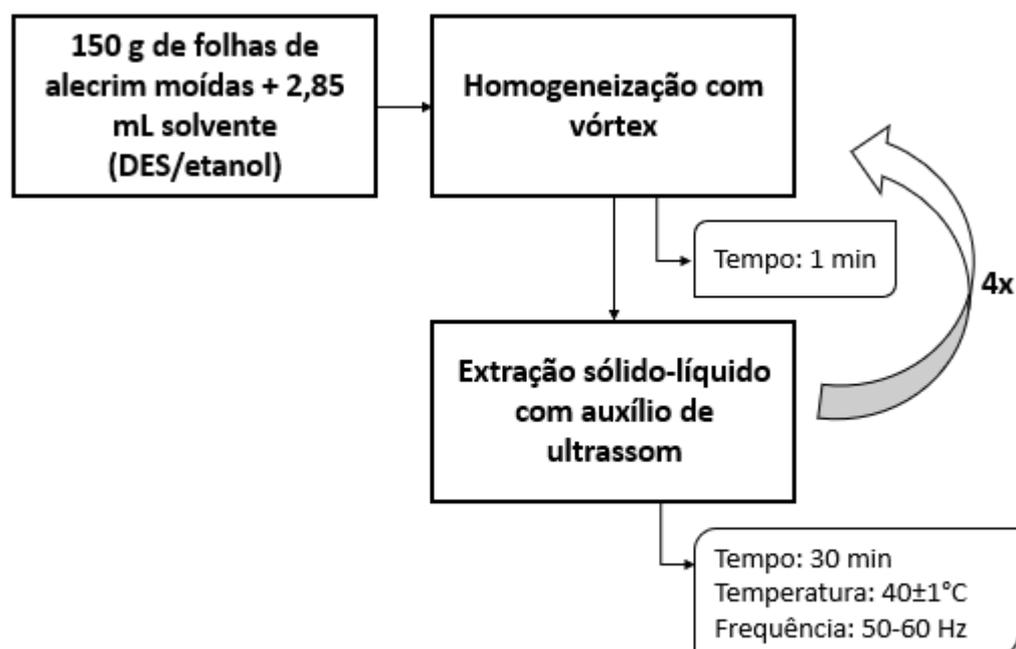


FIGURA 9 - ETAPAS DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO ALECRIM.
FONTE: A autora, (2018).

4.2.8 Determinação do teor de fenólicos totais por Folin Ciocalteu (TFC)

Para determinação dos compostos fenólicos extraídos do alecrim foi utilizada a metodologia proposta por Singleton & Rossi (1965) e modificada por Bakirtzi et al. (2016).

O método espectrofotométrico utiliza o reagente Folin-Ciocalteu, constituído de uma mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungústico, na qual

o molibdênio e o tungstênio se encontram no estado de oxidação 6^+ . Porém, na presença de alguns agentes redutores, como os compostos fenólicos, tornam-se os chamados molibdênio e tungstênio azul. A mudança no estado de oxidação dos metais permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, as quais são obtidas a partir da absorbância medida por espectrometria no comprimento de onda de 720 nm.

No processo primeiramente é adicionado 1,68 mL de água em eppendorfs e em seguida são adicionados 20 μ L do extrato diluído em água (1:10 v/v) e 100 μ L do reagente Folin-Ciocalteu. Em seguida a mistura é mantida em repouso no escuro por um período de 3 minutos. Por fim, é adicionada uma solução de Na_2CO_3 20% (m/v) para interromper a reação.

A solução deve permanecer no escuro por 60 minutos até o momento da leitura da absorbância em 720 nm, utilizando um espectrofotômetro U-V visível (Shimadzu, UV-1800, Tóquio, Japão), com cela de quartzo com 1 cm de caminho óptico, utilizando-se uma mistura de água, reagente Folin e solução de Na_2CO_3 , nas mesmas proporções como branco. Para determinar as concentrações dos extratos uma curva padrão com ácido gálico é construída com as concentrações variando de 0,1 a 0,8 mg/mL. Os resultados obtidos são expressos em mg de ácido gálico por mL do extrato (mgAG/mL).

4.2.9 Determinação da atividade antioxidante

Antioxidantes são definidos como compostos que, em baixa concentração em relação ao substrato, inibem ou atrasam a oxidação desse substrato de maneira eficaz. O sistema de defesa antioxidante do organismo humano pode ser formado por compostos enzimáticos e não enzimáticos e que podem ocorrer naturalmente ou são ingeridos na alimentação. (RUFINO et al., 2006, 2007a).

Existem diversas metodologias para determinação dos compostos antioxidantes, dos quais duas foram empregados neste trabalho. A escolha foi realizada considerando que uma metodologia complementa a outra, ou seja, enquanto que o método de DPPH se baseia pela captura do radical orgânico, o método FRAP é fundamentado no poder de redução do metal.

Método de sequestro de radicais - DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

Brand-Williams et al., (1995) foram os primeiros a descrever o método, que consiste na estabilização do radical livre DPPH• pela ação de um antioxidante, resultando na mudança de cor de violeta escuro para violeta claro. A reação ocorrida é mostrada na Figura 10.

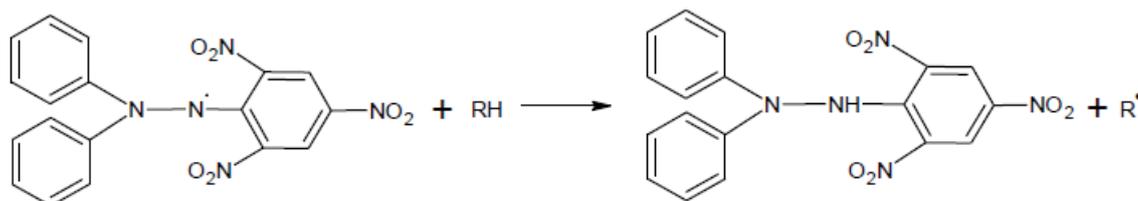


FIGURA 10 - CAPTURA DO DPPH• PELA AÇÃO DE UM ANTIOXIDANTE.
FONTE: MEDEIROS M. L. (2013).

Diferentes soluções são preparadas com metanol para construção de uma curva padrão, utilizando um padrão de trolox nas concentrações de 0,2 a 0,9 mmol/L. Uma alíquota de 50 μ L do extrato diluído 1:10 v/v com água é transferida para tubos de *ependorf* com 1,95 mL de solução metanólica de DPPH 0,024 g/L. Após agitação, os tubos são mantidos em repouso por 30 minutos e em seguida conduzidos para as leituras da absorbância por espectrofotometria (Shimadzu, UV-1800, Tóquio, Japão) no comprimento de onda de 517 nm, previamente calibrado utilizando metanol como branco.

Método de redução do ferro – FRAP (*Ferric Reduction Antioxidant Power*)

Este método consiste na redução de Fe (III) com coloração azul clara à Fe (II) com coloração azul escura, existentes no complexo *2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine* (TPTZ), na presença de um antioxidante. A reação ocorrida é mostrada na Figura 11.

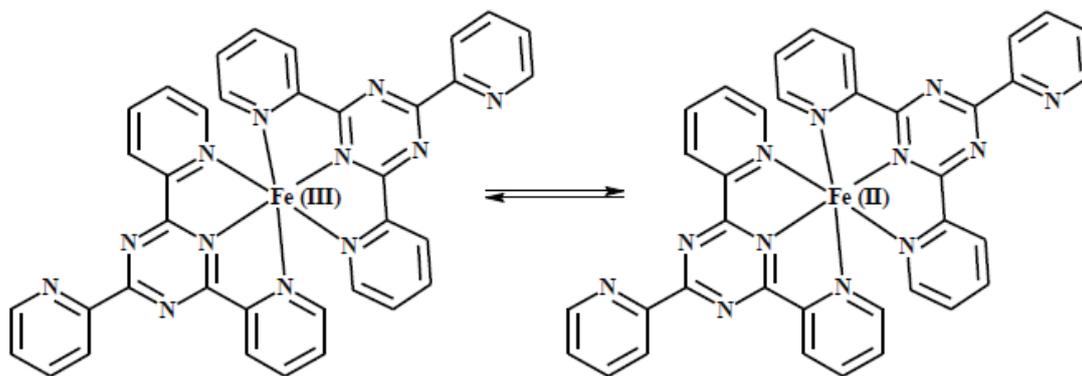


FIGURA 11 - REDUÇÃO DE FE (III) À FE (II) NO COMPLEXO TPTZ.
 FONTE: MEDEIROS M. L. (2013).

A capacidade antioxidante do extrato é determinada segundo metodologia de Benzie e Strain, (1996).

Diferentes soluções de trolox foram preparadas para construção da curva padrão nas mesmas concentrações utilizadas para metodologia DPPH. Alíquota de 50 μL do extrato diluído 1:10 v/v com água são transferidas para tubos de *ependorf* com 1,50 mL de solução FRAP (160 mL de solução tampão de acetato 300 mM pH 3,63, 16 mL de solução de cloreto férrico – FeCl_3 20 mM e 16 mL de solução 2,4,6-tripidil-s-tri-azine – TPTZ 10 mM em HCl 40 mM). Após agitação, os tubos são mantidos em repouso por 30 minutos para em seguida são serem conduzidos para as leituras de absorbância. Foi utilizado um espectrofotômetro (Shimadzu, UV-1800, Tóquio, Japão), sendo a absorbância medida no comprimento de onda de 593 nm. O equipamento foi previamente calibrado utilizando a solução de FRAP como branco.

4.2.10 Análise HPLC

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi empregada neste trabalho a fim de quantificar os principais compostos fenólicos obtidos nos extratos. A identificação e quantificação dos compostos fenólicos dos extratos de alecrim foram realizadas com uma coluna com detector de arranjo de diodos

(DAD). O método aplicado foi baseado em BELMIRO et al., (2017) com algumas adaptações.

Os extratos obtidos foram filtrados em filtros de seringa de nylon 0,22 μm , sendo que deste 20 mL foram injetados na coluna cromatográfica mantida à temperatura de 30°C. A separação cromatográfica foi realizada empregando uma coluna ACE 5 C18 (Lote V13-7473; ACE, Aberdeen, Escócia), com 250 mm x 4,6 mm, 5 μm de tamanho de partícula, 110 Å de porosidade de partícula. Foi mantida uma vazão constante em 1,2 mL.min⁻¹. A fase móvel foi composta por 0,1% v/v de água: ácido fórmico (fase móvel A) e acetonitrila (fase móvel B). As condições de eluição foram: 0 - 15 min, B de 8% a 30% (5 min), 22-35 min - B de 30% a 70% (10 min); e 35 - 40 min, B de 70% a 8%. O DAD registrou os espectros de 200 a 400 nm e a quantificação foi realizada por comprimentos de onda específicos: 270 nm para a rutina e para a naringina; 280 nm para o 7-metilrosmanol e 330 nm para os demais (cafeína, ácido ferúlico e ácido rosmarínico).

Os padrões contendo os compostos fenólicos (ácido rosmarínico, cafeína, 7-metilrosmanol, rutina, naringina e ácido ferúlico) foram preparados anteriormente aos seus usos. As soluções estoque foram diluídas com metanol:água 40%, com exceção da solução de 7-metilrosmanol, a qual foi diluída com acetonitrila. As soluções obtidas, as quais foram utilizadas na obtenção das curvas de calibração, apresentaram as seguintes concentrações: 1,150 mg.mL⁻¹ para cafeína; 0,203 mg.mL⁻¹ para rutina; 1,450 mg.mL⁻¹ para ácido ferúlico; 1,000 mg.mL⁻¹ para naringina; 1,000 mg.mL⁻¹ para ácido rosmarínico e 0,500 mg.mL⁻¹ para 7-metilrosmanol.

4.2.11 Validação do método de HPLC proposto

Quatro parâmetros foram selecionados para avaliar o desempenho do método proposto: repetibilidade, linearidade, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), segundo o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) DOQ-GRCRE-008 (2016).

As respostas de linearidade e repetibilidade foram determinadas injetando as soluções padrões em seis concentrações diferentes. As curvas de calibração foram construídas utilizando a área do pico e a concentração das soluções

padrões. A linearidade foi avaliada pelo valor do coeficiente de correlação (R^2). Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), definidos como $3,3 \text{ SD}_b/m$ e $10 \text{ SD}_b/m$, respectivamente (onde SD_b corresponde ao desvio padrão da concentração das soluções padrões e m é a inclinação do gráfico de calibração).

4.2.12 Determinação da cinética de degradação dos extratos

A partir de leituras da absorbância das amostras, utilizando a metodologia de DPPH•, para determinação da capacidade antioxidante *in vitro*, pode-se traçar a curva cinética dos compostos antioxidantes presentes nos extratos e avaliar, a partir disso, a eficácia dos mesmos em intervalos de tempo variáveis. A extração foi realizada em banho de ultrassom a 40 ± 1 °C. A relação massa/volume entre o soluto e o solvente foi de 1:20 m/v e o tempo de extração de 2 horas. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A cinética de degradação dos extratos obtidos foi realizada a $25 \pm 0,5$ °C, sendo para tanto utilizado um banho ultratermostático (Lab Compain, RW-1025G, $\pm 0,5$ °C). As amostras de extrato, aproximadamente 1 mL, foram armazenadas em tubos eppendorf e foram acondicionadas imersas no banho até o momento da análise.

Dois modelos cinéticos distintos foram utilizados na correlação com os dados experimentais. Haefner (2005), defende que os modelos servem para três propósitos principais: entender, prever e controlar os sistemas termodinâmicos. As equações cinéticas que avaliam a qualidade dos alimentos normalmente são modeladas por meio de uma reação de ordem zero ou primeira ordem (LABUZA, 1984; SAGUY AND KAREL, 1980). Os modelos gerais que descrevem as reações cinéticas são descritos pela equação (2), quando $n \neq 1$, e pela equação (3) para o caso de $n=1$.

$$c^{1-n} = c_0^{1-n} + (n - 1)kt \quad (2)$$

$$c = c_0 \exp(-kt) \quad (3)$$

Nas quais, c corresponde à concentração em um tempo (min) qualquer; c_0 corresponde à concentração no tempo 0; k é a constante de velocidade da reação (min^{-1}) e t é o tempo (min).

Os modelos empíricos vêm sendo cada vez mais empregados em substituição aos modelos cinéticos convencionais (PELEG, 1988; CUNHA et al., 2001, MARABI et al., 2003; CORRADINI, PELEG, 2007; AMODIO et al. 2015). Entre eles, o modelo de *Weibull* é considerado ideal para reações de degradação de substâncias, as quais podem ser consideradas probabilísticas, onde dois estados coexistem. Este modelo apresentou bons ajustes em reações de degradação de antioxidantes (OMS-OLIU et al., 2009), degradação da vitamina C (CORRADINI, PELEG, 2007; AMODIO et al. 2015) e degradação de riboflavina durante tratamentos térmicos (CORRADINI, PELEG, 2006).

Sendo assim, a cinética de degradação dos compostos fenólicos presentes nos extratos de alecrim foi avaliada comparando o modelo cinético convencional de primeira ordem com o modelo empírico de *Weibull*. Boekel (2002), descreve o modelo como sendo uma distribuição cumulativa, dada pela equação (4), sendo que, conforme relatado por Corradini e Peleg (2006), como a equação (4) possui um coeficiente angular ($1/\alpha$) com unidade de taxa (min^{-1}), esta pode ser considerada como um modelo cinético empírico.

$$S(t) = \exp \left[- \left(\frac{t}{\alpha} \right)^\beta \right] \quad (4)$$

Sendo que S corresponde à variável independente; t é o tempo do processo; α (min) é o fator de escala (determina a variação da distribuição); β (adimensional) é o fator de forma, onde valores abaixo de 1 resultam em uma curva côncava e valores acima de 1 resultam em uma curva convexa.

A equação (4) pode ser reescrita conforme a equação (5), onde $C(t)$ corresponde à concentração em um determinado tempo (min); C_0 correspondem à concentração no instante inicial igual a 0 e k_α (min^{-1}) é a constante cinética, a qual corresponde ao inverso do fator de escala (α).

$$C(t) = C_0 \exp[-(t \cdot k_\alpha)^\beta] \quad (5)$$

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$), que corresponde ao tempo necessário para a degradação de 50% dos compostos antioxidantes, foi calculado utilizando a equação (6), na qual k corresponde à constante cinética da reação.

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \quad (6)$$

4.2.13 Análise estatística dos dados

Para análise estatística dos resultados obtidos foi utilizado a análise unidirecional de variâncias (ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas (teste de Tukey), em que $p < 0,05$ foi considerado significativo para comparação.

Os dados obtidos foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *Software Statistica* (versão 10.0, StatSoft).

5. RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos dos experimentos realizados ao longo do trabalho. Inicialmente, para se conhecer melhor a matéria-prima utilizada, o alecrim foi moído e caracterizado físico-quimicamente em termos de umidade, lipídeos e cinzas e foi realizada a caracterização do seu diâmetro médio de partícula. Em seguida foram realizados os processos de extração sólido-líquido afim de se obter os compostos fenólicos presentes no alecrim, para isso foram utilizados diferentes solventes eutéticos profundos (DES) à base de cloreto de colina (ChCl) e o etanol 100%.

O processo de extração foi investigado quanto à relação soluto-solvente, tempo e temperatura de extração. Os extratos obtidos com os melhores parâmetros de extração foram avaliados quanto ao teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante. Além disso, foi realizado um estudo da cinética de degradação dos compostos antioxidantes. Os extratos também foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ALECRIM EM PÓ

A composição química do alecrim está ilustrada na Figura 12, os resultados foram expressos em base úmida. A maior parte da matriz é composta por umidade (10,08%±0,08) e lipídeos (8,63%±0,91). Pode-se dizer que os compostos fenólicos polares encontram-se em sua maioria na fase aquosa/polar, enquanto os apolares encontram-se na fase lipídica/polar.

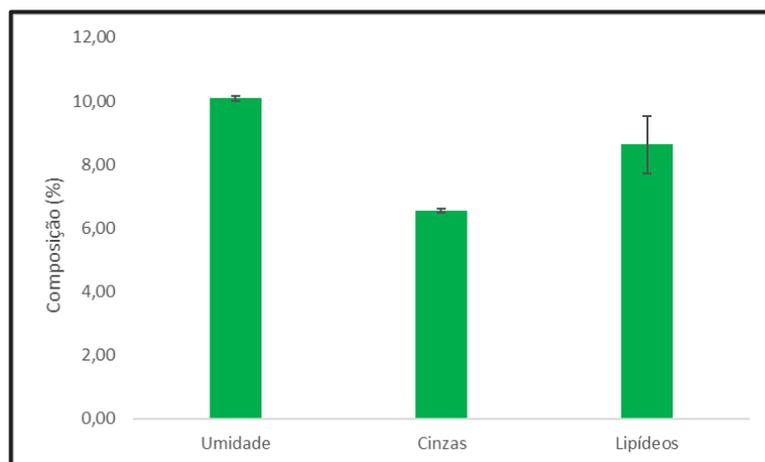


FIGURA 12 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ALECRIM.
Fonte: A autora, 2018.

Pela Figura 13 pode-se verificar que o alecrim em pó variou de partículas de 0,085 cm (0,01%); 0,08 cm (0,14%); 0,0425 cm (0,22 %); 0,03 cm (0,35%); 0,018 cm (0,14%); 0,015 cm (0,08%); 0,0106 cm (0,03% e <0,0106 cm (0,03%). Como o objetivo do trabalho era avaliar os compostos antioxidantes presentes no alecrim como um todo, optou-se por trabalhar com todas as porções da matriz. Sendo assim, considerou-se o diâmetro médio das partículas igual a 0,0199 cm.

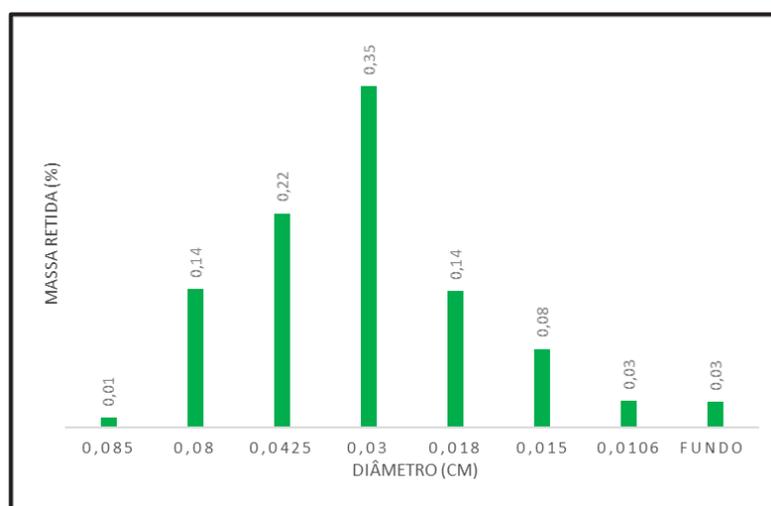


FIGURA 13 - GRANULOMETRIA DO ALECRIM EM PÓ
Fonte: A autora, 2018.

5.2 EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO – RENDIMENTO E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A extração dos compostos antioxidantes do alecrim foi realizada conforme o esquema apresentado na Figura 9 (Seção 4.3). As variáveis temperatura de extração e tempo de extração foram avaliadas para uma relação massa de soluto por volume de solvente de 1:20 (m/v), condições pré-estabelecida por resultados de trabalhos do grupo.

Uma análise prévia foi realizada com os solventes CGH, CAOH e etanol 100%, afim de se estabelecer a temperatura e o tempo ideais para o processo de extração. Os resultados encontrados estão representados nas Tabela 7 e Tabela 8 . Em um primeiro momento fixou-se o tempo de extração em 120 minutos e avaliou-se a melhor temperatura de extração, resultados obtidos na Tabela 7. Após encontrada a melhor temperatura de extração, fixou-se a temperatura e avaliou-se a o melhor tempo, resultados obtidos na Tabela 8. Os dados obtidos foram comparados em termos de rendimento de extração, por meio da metodologia de Folin & Ciocalteau e pela capacidade antioxidante, obtida pela metodologia DPPH•. Pode-se avaliar as condições pelos resultados obtidos com a relação entre a capacidade antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais (DPPH/TFC). Sendo assim, pode-se verificar nas Tabela 7 eTabela 8 que os melhores resultados foram obtidos com tempo de extração de 120 minutos na temperatura de 40 °C.

TABELA 7 - AVALIAÇÃO DA MELHOR TEMPERATURA DE EXTRAÇÃO.

Temperatura (°C)	Solvente	TFC (mg _{AG} /g)	DPPH (mM _{ET} /g)	DPPH/TFC
40	CGH	22,53±3,59 ^a	155,83±1,93 ^a	6,92
	CAOH	57,60±1,69 ^b	137,65±1,17 ^b	2,39
	Etanol 100%	49,14±3,47 ^c	132,19±1,56 ^c	2,69
60	CGH	87,678±1,15 ^a	130,739±0,98 ^a	1,49
	CAOH	95,622±2,04 ^b	126,386±1,12 ^b	1,32
	Etanol 100%	94,675±0,98 ^b	125,02±2,09 ^b	1,32
25	CGH	18,94±0,98 ^a	51,74±2,47 ^a	2,73
	CAOH	14,61±1,76 ^b	14,45±0,64 ^b	0,99
	Etanol 100%	16,88±2,01 ^a	24,98±1,74 ^a	1,48

*Valores obtidos correspondem as médias de três replicatas independentes ± desvio padrão (DP). Valores encontrados na mesma coluna com letras sobrescritas diferentes indicam que os dados não possuem diferenças significativas entre si ($p < 0,05$).

**Proporção entre capacidade antioxidante (DPPH/TFC) e compostos fenólicos totais.

CGH – água, glicerol e cloreto de colina; CALH – água, ácido láctico e cloreto de colina; CPH – água, 1,2-propanodiol e cloreto de colina; CAOH – água, ácido oxálico e cloreto de colina.

Fonte: A autora, 2018.

TABELA 8 - AVALIAÇÃO DO MELHOR TEMPO DE EXTRAÇÃO.

Tempo (min)	Solvente	TFC (mg _{AG} /g)	DPPH (mM _{ET} /g)	DPPH/TFC
120	CGH	22,53±3,59 ^a	155,83±1,93 ^a	6,92
	CAOH	57,60±1,69 ^b	137,65±1,17 ^b	2,39
	Etanol 100%	49,14±3,47 ^c	132,19±1,56 ^c	2,69
240	CGH	49,804±2,09 ^a	110,425±1,13 ^a	2,22
	CAOH	58,798±1,45 ^b	126,13±2,20 ^b	2,14
	Etanol 100%	50,106±1,16 ^c	91,563±1,96 ^c	1,83
60	CGH	19,905±1,02 ^a	51,422±1,14 ^a	2,58
	CAOH	26,68±1,00 ^b	16,112±1,09 ^b	0,60
	Etanol 100%	21,32±0,98 ^c	55,17±0,67 ^c	2,58

*Valores obtidos correspondem as médias de três replicatas independentes ± desvio padrão (DP). Valores encontrados na mesma coluna com letras sobrescritas diferentes indicam que os dados não possuem diferenças significativas entre si ($p < 0,05$).

**Proporção entre capacidade antioxidante (DPPH/TFC) e compostos fenólicos totais.

CGH – água, glicerol e cloreto de colina; CALH – água, ácido láctico e cloreto de colina; CPH – água, 1,2-propanodiol e cloreto de colina; CAOH – água, ácido oxálico e cloreto de colina.

Fonte: A autora, 2018.

Os resultados obtidos com as melhores condições de extração dos compostos fenólicos do alecrim, utilizando os quatro diferentes DES e o etanol 100% estão apresentados na Tabela 9. Os resultados para o teor de compostos fenólicos totais (Folin & Ciocalteu) e as atividades antioxidantes dos extratos (DPPH• e FRAP•) foram avaliados estatisticamente por análise unidirecional de variância (ANOVA) utilizando o *Software Statistica* para Windows 8.0 (StatsoftInc., EUA). As diferenças significativas ($p < 0,05$) foram analisadas pelo teste de Tukey.

TABELA 9 - RESULTADOS PARA O TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (TFC) E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH E FRAP) DOS EXTRATOS DE ALECRIM OBTIDOS COM OS SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS (DES) E O ETANOL 100%*.

Solvente	TFC ¹	DPPH ²	FRAP ³	**DPPH/TFC	**FRAP/TFC
CGH	22,53±3,59 ^b	155,83±1,93 ^a	126,23±14,81 ^a	6,92	5,60
CAOH	57,60±1,69 ^a	137,65±1,17 ^c	163,23±10,76 ^{b,c}	2,39	2,83
CALH	59,85±1,24 ^a	132,53±1,17 ^d	183,82±20,32 ^c	2,21	3,07
CPH	62,21±3,85 ^a	150,63±0,30 ^b	148,24±8,75 ^{a,b}	2,42	2,38
*Etanol	49,14±3,47 ^c	132,19±1,56 ^d	49,14±3,47 ^d	2,69	1,32

*Valores obtidos correspondem as médias de três replicatas independentes \pm desvio padrão (DP). Valores encontrados na mesma coluna com letras sobrescritas diferentes indicam que os dados não possuem diferenças significativas entre si ($p < 0,05$).

**Proporção entre capacidade antioxidante (FRAP/TFC) e compostos fenólicos totais.

¹mg equivalente de ácido gálico / g de material vegetal (TPC, conteúdo de fenólicos totais); ²mM equivalente Trolox / g material vegetal (DPPH, medição da atividade de radicais livres); ³mM equivalente Trolox / g material vegetal (FRAP, energia antioxidante redutora de ferro).

CGH – água, glicerol e cloreto de colina; CALH – água, ácido láctico e cloreto de colina; CPH – água, 1,2-propanodiol e cloreto de colina; CAOH – água, ácido oxálico e cloreto de colina.

A principal desvantagem dos solventes eutéticos profundos (DES) frente aos solventes convencionais é a alta viscosidade, a qual dificulta a transferência de massa entre soluto-solvente (DAI, Y., WITKAMP, G. J., VERPOORTE, R., & CHOI, Y., 2013). Pensando nisso, neste trabalho foram adicionados 10% (v/v) de água aos DES logo após a sua formação com o intuito de facilitar a transferência de massa durante o processo de extração.

Além disso, a presença de 10% (v/v) de água nos DES altera a polaridade do solvente e conseqüentemente a solubilidade dos compostos fenólicos nestes solventes. Durante o processo, os DES constituídos pelos ácidos láctico e oxálico foram os que apresentaram características mais polares, seguidos pelos DES à base de álcoois (glicerol e 1,2-propanodiol) (DAI, 2013).

Para se comparar a eficiência de extração entre os solventes eutéticos profundos (DES) e o etanol 100% utilizou-se a metodologia de compostos fenólicos totais (TFC). Pode-se observar na Tabela 9 que todos os extratos obtidos com os DES, exceto o CGH (ChCl:glicerol:água), apresentaram eficiência de extração superiores ao extrato etanólico. Em relação aos DES, a eficiência de extração (valores de TFC) dependeram do par ChCl:HBD, sendo o maior valor obtido foi com o par ChCl:1,2-propanodiol (CPH) ($62,21 \pm 3,85$). Além disso, os DES à base de ácido, também apresentaram rendimentos superiores ao etanol. De acordo com DAI et al., (2014), os resultados para TFC obtidos com os solventes à base de ácido, formados pelo ácido láctico e ácido oxálico, poderiam ser explicados devido às interações por ligações de hidrogênio entre as moléculas dos solventes e os compostos fenólicos, onde os principais constituintes encontrados no alecrim são ácidos fenólicos, como o ácido rosmarínico.

Em relação à atividade antioxidante avaliada pela metodologia FRAP, o etanol foi o solvente que apresentou o menor valor entre os solventes avaliados, como pode ser visto na Tabela 9 e Figura 14. O extrato obtido com etanol apresentou capacidade antioxidante (49,13 mM trolox equivalente/ g alecrim) em torno de três vezes menor que os extratos obtidos utilizando DES como solvente (126,23 a 183,82 mM trolox equivalente/ g alecrim), demonstrando que estes solventes podem contribuir positivamente para a transferência de elétrons. A capacidade dos DES em estabilizar compostos fenólicos pode ser explicada por suas interações intermoleculares, principalmente devido às ligações de hidrogênio entre os compostos fenólicos ácidos encontrados nos extratos de alecrim e o solvente. Estas interações reduzem a degradação oxidativa, pois diminuem o movimento das moléculas de soluto e, conseqüentemente, reduzem o contato com o oxigênio na interface do DES e do ar (DAI et al., 2016).

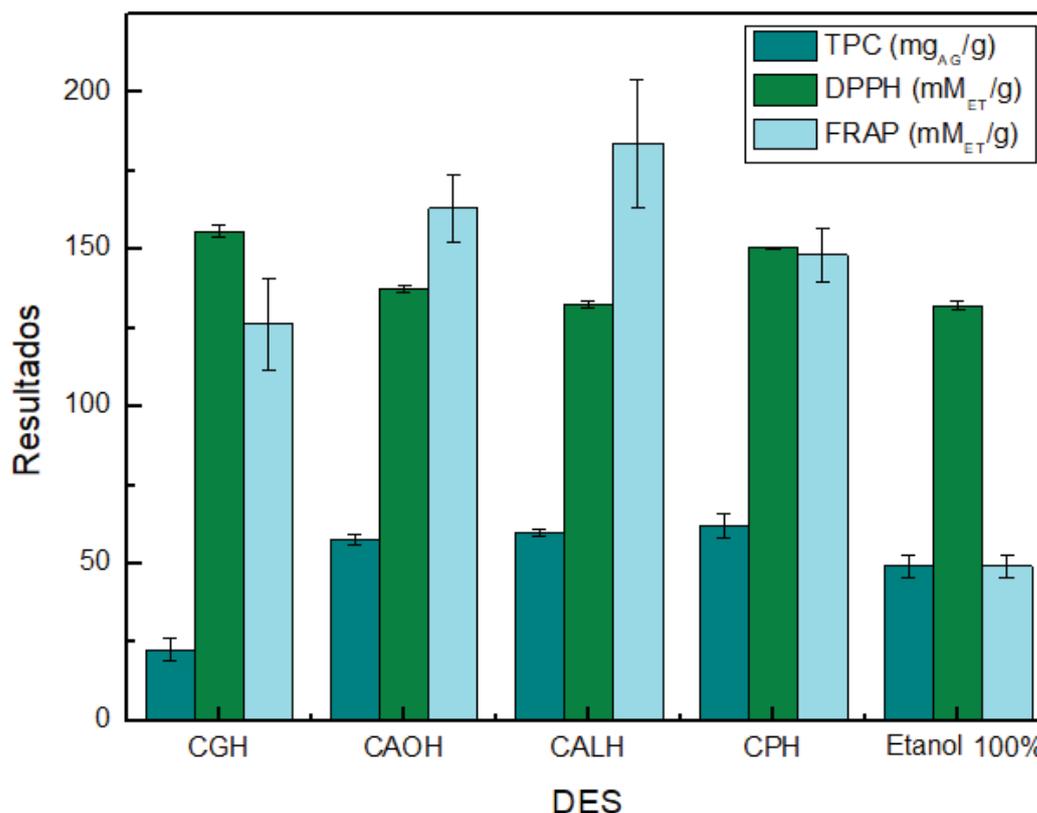


FIGURA 14 - COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (TFC) E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH E FRAP) DE QUATRO DIFERENTES COMPOSTOS FENÓLICOS PROFUNDOS (DES) E ETANOL 100%.

FONTE: A autora, (2018).

Com relação aos ensaios realizados pela metodologia DPPH, três dos solventes estudados, CGH (155,83 mM trolox equivalente/ g alecrim), CPH (150,63 mM trolox equivalente/ g alecrim) e CAO (137,65 mM trolox equivalente/ g alecrim), apresentaram atividade antioxidante de 4 a 18% superior à apresentada pelo extrato etanólico (132,53 mM trolox equivalente/ g alecrim). Além disso, o CGH foi o DES que apresentou o maior valor de DPPH e o menor valor de FRAP, o que pode ser explicado pelos diferentes mecanismos de ação dos métodos. Este solvente também possui o menor valor avaliado de TFC, mesmo quando comparado ao etanol.

A partir dos resultados obtidos pela razão entre DPPH e FRAP com TFC pode-se avaliar melhor as diferenças nos mecanismos de ação dos DES. Para todos os DES avaliados, os valores de FRAP/TFC variaram de 2,38 a 5,60, os quais são superiores ao valor obtido para o etanol (FRAP/TFC = 1,32), o que

indica que a atividade antioxidante está relacionada à doação de elétrons. Entretanto, quando o mecanismo é radicalar, avaliado pela metodologia de DPPH, apenas o solvente CGH apresentou alta estabilidade.

5.3 ANÁLISE DE HPLC-DAD DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Seis constituintes fenólicos encontrados nos extratos de alecrim (ácido rosmarínico, cafeína, 7-metilrosmanol, rutina, naringina e ácido ferúlico) foram separados e quantificados pelo método HPLC-DAD estabelecido. Anteriormente às análises, o método de HPLC foi validado de acordo com o INMETRO. A curva de regressão destes compostos apresentou boa linearidade comprovada pelo coeficiente de determinação ($R^2 > 0,9972$) e os valores encontrados para LD e LQ dos analitos individuais mostraram que o método analítico era adequado, Tabela 10. O coeficiente de variação (CV) para todas as concentrações de compostos fenólicos foi pequeno, sendo $CV < 2,5\%$ para o ácido rosmarínico; $CV < 5,5\%$ para cafeína; $CV < 2,4\%$ para o 7-metilrosmanol; $CV < 4,1\%$ para a rutina; $CV < 4,1\%$ para a naringina e $CV < 3,0\%$ para o ácido ferúlico. Os resultados demonstraram que o método desenvolvido é reprodutível e possui os requisitos de repetibilidade e estabilidade para o HPLC.

Considerando todos os solventes, incluindo o etanol, apenas o CAOH e o CALH foram capazes de extrair os seis compostos fenólicos presentes no alecrim, como mostra a Tabela 11. Os solventes CALH e CPH foram os que apresentaram maior conteúdo fenólico, assim como obtido pelo método TFC (Tabela 9). Além disso, os extratos obtidos com CALH e CPH apresentaram abundância em ácido rosmarínico (12675,96 e 13563,01 $\mu\text{g/g}$, respectivamente), especialmente quando comparados ao extrato etanólico (5027,27 $\mu\text{g/g}$). O extrato CALH também apresentou os maiores teores de cafeína (241,31 $\mu\text{g/g}$), rutina (519,90 $\mu\text{g/g}$) e ácido ferúlico (807,02 $\mu\text{g/g}$) quando comparado aos demais extratos. A cafeína não foi detectada no extrato obtido com CGH e sua concentração não apresentou diferença significativa nos extratos obtidos com CAOH, CPH e etanol. Em relação ao 7-metil-mananol, o maior rendimento foi obtido na extração com etanol (11534,93 $\mu\text{g/g}$). A rutina não foi detectada no extrato de CPH e o etanol não foi

capaz de extrair a naringina. O teor de ácido ferúlico no extrato etanólico foi o mais baixo (135,36 $\mu\text{g} / \text{g}$) quando comparado aos outros solventes estudados. Em geral, os resultados mostraram que os solventes DES apresentaram maiores capacidades de extração para os compostos ácido rosmarínico, cafeína, rutina, naringina e ácido ferúlico, quando comparados ao etanol, com exceção do ácido 7-metilrosmanol.

TABELA 10 – PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO PARA O MÉTODO DE HPLC*.

Composto	UV banda (nm)	Tempo de retenção (min)	Equação de regressão	R ²	Desvio padrão residual		Curva analítica	
					LD (ug/L)	LQ (ug/L)	LD (ug/L)	LQ (ug/L)
Ácido Rosmarínico*	330	15.66	$y = -0.2268 + 0.8724x$	0.9999	10	20	1.195	1.765
Cafeína	330	9.35	$y = -0.0702 + 0.0021x$	0.9972	<0,005	0,006	108	160
7-Metilrosmanol	280	30.1	$y = 0.0041 + 0.0007x$	0.9995	<313	625	959	1415
Rutina	270	12.13	$y = 0.0074 + 0.0004x$	0.9993	0,007	0,016	56,8	84
Naringina	270	14.78	$y = 0.0047 + 0.0005x$	1.000	0,016	0,025	81,14	119,3
Ácido Ferrúlico	330	13.32	$y = 0.0172 + 0.0015x$	1.000	<0,005	0,005	54,79	80,56

*O composto ácido rosmarínico foi quantificado em µg/mL. Valores obtidos correspondem as médias de três replicatas independentes ± desvio padrão (DP). Valores encontrados na mesma coluna com letras sobrescritas diferentes indicam que os dados não possuem diferenças significativas entre si (p<0,05). CGH – água, glicerol e cloreto de colina; CALH – água, ácido láctico e cloreto de colina; CPH – água, 1,2-propanodiol e cloreto de colina; CAOH – água, ácido oxálico e cloreto de colina.

TABELA 11 – CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO ALECRIM (µG/G)*.

	Ácido Rosmarínico	Cafeína	7-methilrosmanol	Rutina	Naringina	Ácido Ferrúlico	Total
CGH	9532.80±88.08 ^a	n.d.	4201.07±102.08 ^a	241.33±3.97 ^a	690.64±28.50 ^a	587.65±2.03 ^a	15251
CAOH	9555.82±74.88 ^a	37.19±0.93 ^a	3876.00±17.26 ^b	323.73±5.47 ^b	953.28±30.21 ^b	733.25±4.12 ^b	15477
CALH	12675.96±84.78 ^b	241.31±13.18 ^b	1999.33±9.52 ^c	519.90±19.67 ^c	1247.36±4.70 ^c	807.02±4.09 ^c	17488
GPH	13563.01±338.25 ^c	43.94±1.45 ^a	4976.93±46.44 ^d	n.d.	1260.91±21.12 ^c	737.87±2.92 ^b	20588
Etanol 100%	5027.27±67.52 ^d	41.16±0.73 ^a	11534.93±87.17 ^e	160.07±6.57 ^d	n.d.	135.36±4.03 ^d	16897

*Valores obtidos correspondem as médias de três replicatas independentes ± desvio padrão (DP). Valores encontrados na mesma coluna com letras sobrescritas diferentes indicam que os dados não possuem diferenças significativas entre si (p<0,05). CGH – água, glicerol e cloreto de colina; CALH – água, ácido láctico e cloreto de colina; CPH – água, 1,2-propanodiol e cloreto de colina; CAOH – água, ácido oxálico e cloreto de colina.

5.4 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE AVALIADA PELA METODOLOGIA DPPH •

A partir de leituras da absorbância das amostras, utilizando a metodologia de DPPH• para determinação da capacidade antioxidante *in vitro*, pode-se traçar a curva cinética dos compostos antioxidantes presentes nos extratos e avaliar, a partir disso a eficácia dos mesmos em intervalos de tempo variáveis até que se atingisse 72 horas. A extração foi realizada em banho de ultrassom, à temperatura de 40°C, sendo a relação massa/volume entre o soluto e o tempo de extração fixados em 1:20 m/v e 2 horas, respectivamente.

Todos os extratos avaliados foram mantidos em temperatura controlada de 25°C. Os resultados de influência do tempo sob a redução da capacidade antioxidante (expressa em porcentagem), conforme apresentado na Figura 15, apresentaram diferença significativa ao longo do tempo. A atividade de DPPH• da amostra CGH, em relação a atividade antioxidante inicial, diminuiu aproximadamente 40%, enquanto que as amostras de CAOH, CALH e CPH diminuíram 35% e a amostra de etanol diminuiu 50%.

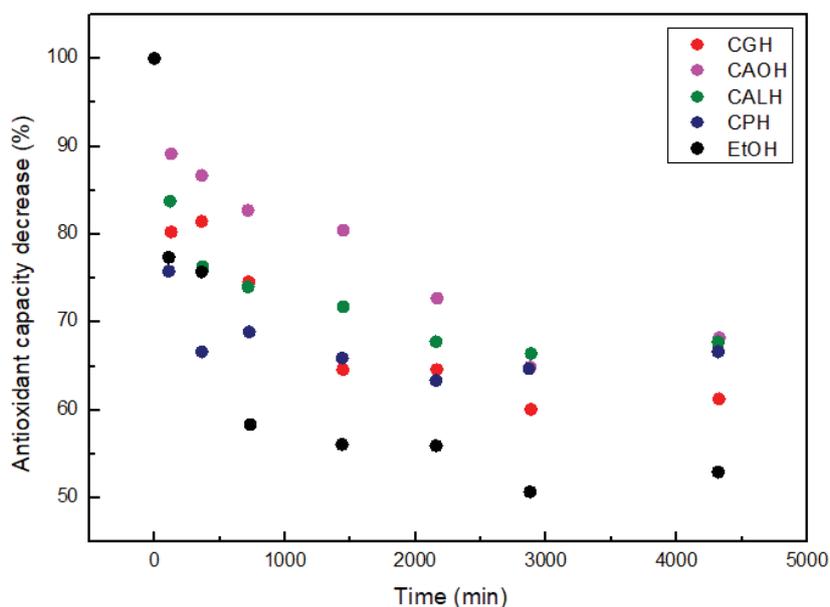


FIGURA 15 - AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TEMPO SOB A DEGRADAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (%).

CGH – água, glicerol e cloreto de colina; CALH – água, ácido lático e cloreto de colina; CPH – água, 1,2-propanodiol e cloreto de colina; CAOH – água, ácido oxálico e cloreto de colina.

FONTE: A autora, (2018).

Os resultados apresentados na Figura 15 mostram que o decaimento relativo da capacidade antioxidante foi maior nos extratos obtidos com o etanol do que nos extratos obtidos com os DES. Neste caso, o extrato obtido com o etanol apresentou a maior perda relativa de atividade antioxidante, ou seja, em relação à sua atividade antioxidante inicial. Além disso, como proposto por ANISSI et al., (2014), as curvas cinéticas dos compostos antioxidantes mostraram que as reações de degradação atingiram um estado estável após um período, e isso depende da relação entre a molécula do reagente DPPH• e a molécula do agente antioxidante.

A cinética da atividade antioxidante mostrou uma fase de degradação inicial e uma final atribuídas a diferentes fenômenos. A reação entre o reagente DPPH• e os antioxidantes acontece pela transferência de um hidrogênio/elétron contido na molécula do antioxidante para o reagente DPPH•. Embora o DPPH-H seja o produto da reação, outros complexos intermediários podem ser formados, onde a característica inicial da reação é de grande rapidez, atribuída à oxidação dos antioxidantes pelo DPPH e subsequente lentidão, regida pelas reações secundárias dos intermediários oxidados. (ANISSI et al., 2014; MÉNDEZ-LAGUNAS et al., 2017).

Neste trabalho, os parâmetros e os coeficientes de determinação da equação cinética de primeira ordem, assim como da equação cinética empírica de *Weibull*, foram determinados com auxílio do software *OriginPro 8.5* e o desvio médio quadrático (RMSD do inglês, *root-mean-square-deviation*) foi utilizado para comparar as concentrações experimentais com as obtidas pelos modelos cinéticos, sendo que quanto maior o seu resultado, menor a qualidade do ajuste.

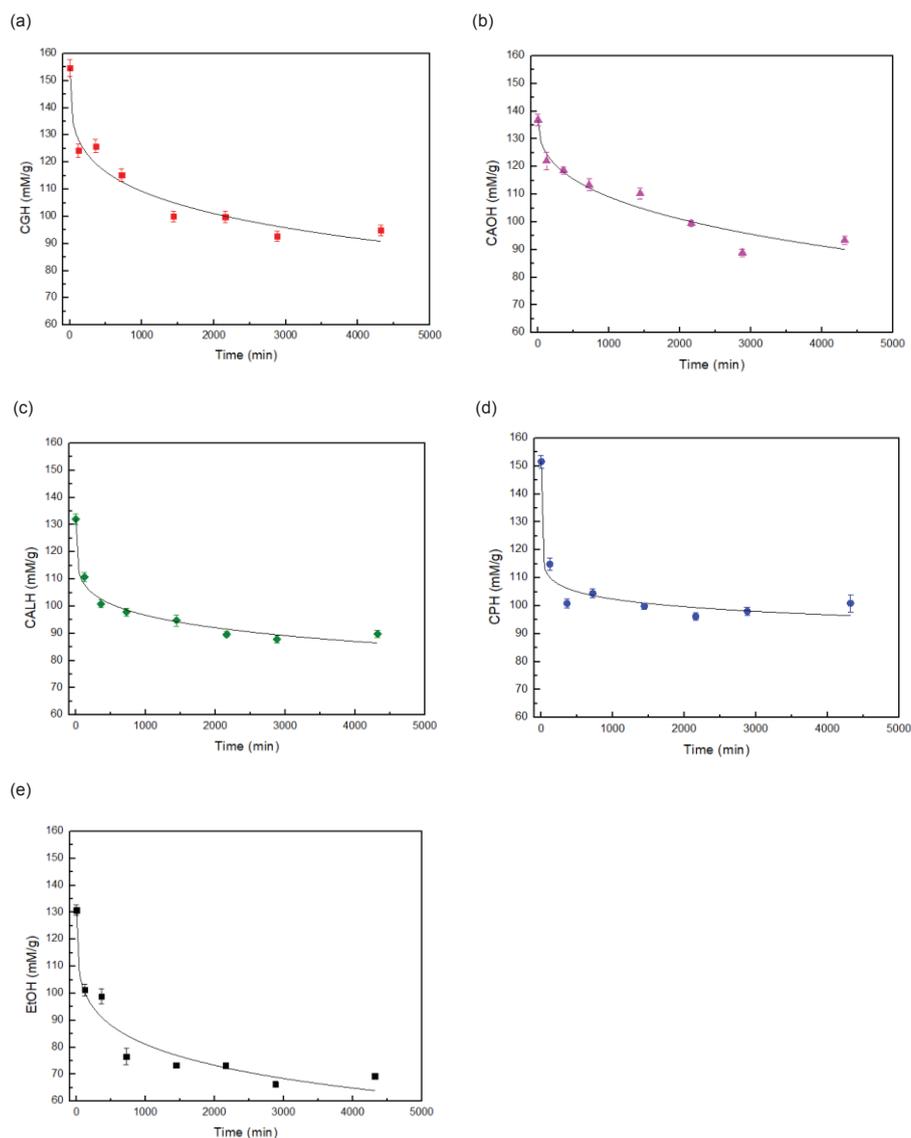


FIGURA 16 - APLICAÇÃO DO MODELO DE WEIBULL NAS CURVAS DE DEGRADAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS FENÓLICOS.

CGH – água, glicerol e cloreto de colina; CALH – água, ácido láctico e cloreto de colina; CPH – água, 1,2-propanodiol e cloreto de colina; CAO – água, ácido oxálico e cloreto de colina.

FONTE: A autora, (2018).

Os resultados apresentados na Tabela 12 indicam que o modelo de Weibull apresentou uma melhor correlação aos dados experimentais para todos os extratos avaliados. Os valores encontrados para a forma constante (β) variando de 0,097 a 0,417, indicou que no início a reação de degradação dos compostos antioxidantes ocorre rapidamente. A partir dos valores da constante cinética de Weibull ($k\alpha$) foi possível obter o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) dos extratos, os quais variaram entre 7 e 49 dias, sendo que o tempo de meia-vida do extrato etanólico foi o menor dentre todos os extratos avaliados. É possível perceber que além da

maior eficiência de extração dos DES, os mesmos apresentam maior capacidade de estabilização dos compostos fenólicos em relação ao etanol.

TABELA 12 - QUALIDADE DO AJUSTE DO MODELO CINÉTICO DE PRIMEIRA ORDEM E MODELO CINÉTICO EMPÍRICO DE WEIBULL*

Solvente	Modelo cinético	k/k_α (min^{-1})	β	$t_{1/2}$ (d)	R^2	RMSE	χ^2
CGH	Primeira ordem	1,120E-04±3,149E-05	-	4,297	0,644	25,627	158,940
	Weibull	2,664E-05±1,344E-05	0,291±0,044	18,067	0,956	4,440	19,714
CAOH	Primeira ordem	9,241E-05±1,789E-05	-	5,209	0,800	13,514	51,107
	Weibull	2,859E-05±1,405E-05	0,417±0,068	16,837	0,935	4,069	16,559
CALH	Primeira ordem	7,743E-05±2,878E-05	-	6,217	0,481	23,349	113,926
	Weibull	1,243E-05±2,524E-06	0,209±0,026	38,739	0,978	2,185	4,774
CPH	Primeira ordem	6,632E-05±4,075E-05	-	7,258	0,192	38,023	273,166
	Weibull	9,833E-06±1,946E-07	0,097±0,031	48,954	0,959	3,729	13,909
EtOH	Primeira ordem	1,540E-04±5,183E-05	-	3,126	0,555	28,099	221,279
	Weibull	6,922E-05±3,245E-05	0,276±0,052	6,954	0,942	5,383	28,975

* k , constante cinética (min^{-1}); k_α , constante cinética de Weibull (min^{-1}); β , fator de forma; R^2 , coeficiente de determinação; $t_{1/2}$, tempo de meia vida para degradação dos compostos antioxidantes.

**Onde o coeficiente de determinação (R^2), determina o melhor ajuste do modelo estatisticamente, sendo que quanto maior o valor encontrado melhor o ajuste. Já o RMSE, compara os resultados experimentais com os obtidos pela modelagem, onde quanto maior o valor obtido pior é a comparação.

CGH – água, glicerol e cloreto de colina; CALH – água, ácido láctico e cloreto de colina; CPH – água, 1,2-propanodiol e cloreto de colina; CAOH – água, ácido oxálico e cloreto de colina.

6. CONCLUSÃO

A avaliação do potencial extrativo dos solventes eutéticos (DES) profundos quanto aos compostos fenólicos presentes no alecrim mostrou que estes solventes possuem uma grande potência de extração dos compostos fenólicos e também uma grande capacidade para estabilizar biomoléculas quando comparados a outros solventes convencionais, neste caso o etanol. Entre os DES avaliados, o que apresentou o maior valor para a quantidade de compostos fenólicos totais, ou seja, o que apresentou o maior rendimento de extração, foi o CPH (cloreto de colina:água:1,2-propanodiol) ($62,21 \pm 3,85$ mg/g). Além disso, os DES com características ácidas, CAO (cloreto de colina:água:ácido oxálico) e CALH (cloreto de colina:água:ácido láctico), apresentaram rendimentos de extração superiores ao obtido com o etanol 100%, isso pode ser explicado devido às interações por ligações de hidrogênio entre as moléculas dos solventes e os compostos fenólicos, onde os principais constituintes encontrados no alecrim são ácidos fenólicos, como o ácido rosmarínico, como foi mostrado pela análise de HPLC. Quanto a avaliação da capacidade antioxidante dos extratos obtidos pelas metodologias de DPPH• e FRAP•, o DES CGH (cloreto de colina:água:glicerol) foi o que apresentou o maior valor para DPPH•. A razão entre a eficiência de extração (TFC) pela capacidade antioxidante (DPPH/FRAP) mostra que, não necessariamente o solvente que obteve o maior rendimento, foi o que apresentou o melhor resultado de extração. Neste caso, o solvente que apresentou a melhor relação TFC/(DPPH/FRAP) foi o CGH, indicando sua alta capacidade em estabilizar as biomoléculas presentes no alecrim.

O ensaio cinético para avaliar a degradação da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos extraídos mostrou que a capacidade antioxidante do extrato etanólico foi menor durante todos os períodos de análise em comparação com os extratos obtidos pelos DES. Segundo o modelo de *Weibull*, a meia vida ($t_{1/2}$) variou de 7 a 49 dias para os extratos obtidos com os DES, sendo que o extrato etanólico apresentou o menor tempo de meia vida dentre os extratos obtidos. Este resultado demonstra a maior capacidade dos DES em estabilizar

os compostos fenólicos extraídos do alecrim e conseqüentemente garantir a sua atividade antioxidante.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Explorar outras matrizes de compostos fenólicos aplicando diferentes solventes eutéticos profundos (DES);
- Analisar a aplicabilidade dos extratos obtidos a partir dos solventes eutéticos profundos em óleo comercial e avaliar a possível substituição de antioxidantes sintéticos, a exemplo o BHA e BHT.
- Analisar a atividade antimicrobiana dos extratos;
- Avaliar a atividade antioxidante aplicando metodologias *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, A. P.; HARRIS, R. C.; RYDER, K. S.; et al. Green Chemistry Glycerol eutectics as sustainable solvent systems †. , p. 82–90, 2011.

ABBOTT, A. P.; CAPPER, G.; DAVIES, D. L.; RASHEED, R. K.; TAMBYRAJAH, V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures, 2003.

AGUILERA, J. M.; TZIA, C.; LIADAKIS, G. Solid–Liquid Extraction Optimization in Food Engineering. 4. ed. New York, 2003.

ALBU S., JOYCE E., PANIWNKY L., LORIMER P., MASON J. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. Ultrasonics Sonochemistry, p. 261-265, 2004.

ANISSI, J.; HASSOUNI, M. EL; OUARDAOUI, A.; SENDIDE, K. A comparative study of the antioxidant scavenging activity of green tea, black tea and coffee extracts: A kinetic approach. **Food Chemistry**, v. 150, p. 438–447, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.009>>. .

ANNEGOWDA, H. V; BHAT, R.; MIN-TZE, L. Influence of sonication treatments and extraction solvents on the phenolics and antioxidants in star fruits. , v. 49, n. August, p. 510–514, 2012.

ANWAR, K. et al. Effects of Solvent / Solid Ratio and Temperature on the Kinetics of Vitamin C Extraction from *Musa acuminata*. Journal of Applied Science & Process Engineering, v. 2, n. 2, p. 107–115, 2015.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC. International. Gaithersburg, 2005.

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, v. 3, 2016.

BELMIRO, T. M. C.; PEREIRA, C. F.; PAIM, A. P. S. Red wines from South America: Content of phenolic compounds and chemometric distinction by origin. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 114–120, 2017.

BOSILJKOV, T. et al. Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. Food and Bioproducts Processing, v. 102, p. 195–203, 2017.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Science and Technology, v. 28, n.1, p. 25-30, 1995.

BRUNETON, J. Farmagonosia, Fitoquímica. Plantas Medicinales, v. 01, n. 2,

2001.

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, 2017.

CVJETKO BUBALO, M.; ĆURKO, N.; TOMAŠEVIĆ, M.; KOVAČEVIĆ GANIĆ, K.; RADOJČIĆ REDOVNIKOVIĆ, I. Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chem.*, 2016.

DAI, Y., WITKAMP, G. J., VERPOORTE, R., & CHOI, Y., H. Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus tinctorius* L. **Anal. Chem.**, v. 85, p. 6272–6278, 2013.

DAI, Y. **Natural Deep Eutectic Solvents and their application in natural product research and development.** 2013.

DAI, Y.; ROZEMA, E.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. **Journal of Chromatography A**, v. 1434, p. 50–56, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.037>>.

DAI, Y.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). **Food Chemistry**, v. 159, p. 116–121, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.155>>.

DUAN, L.; DOU, L.L.; GUO, L.; LI, P.; LIU, E.H. Comprehensive evaluation of deep eutectic solvents in extraction of bioactive natural products. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2016.

FU, N. et al. Environmentally friendly and non-polluting solvent pretreatment of palm samples for polyphenol analysis using choline chloride deep eutectic solvents. *Journal of Chromatography A*, v. 1492, p. 1–11, 2017.

GARCÍA, G.; APARICIO, S.; ULLAH, R.; ATILHAN, M. *Deep Eutectic Solvents: Physicochemical Properties and Gas Separation Applications*, 2015.

HAYYAN, M.; MJALLI, F. S.; HASHIM, M. A.; ALNASHEF, I. M. A novel technique for separating glycerine from palm oil-based biodiesel using ionic liquids. *Fuel Processing Technology*, 91, p. 116-120, 2010.

HAMMOND, O. S.; BOWRON, D. T.; EDLER, K. J. Liquid structure of the choline chloride-urea deep eutectic solvent (reline) from neutron diffraction and atomistic modelling. *Green Chemistry*, p. 2736–2744, 2016.

KORN, MAURO; PEREIRA, M. G.; BORGES, S. S. Algumas aplicações analíticas dos ultra-sons. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, v. 96, p. 51-6, 2005.

KRUG, F. J., "Methods of Sample De- composition", In: IV Workshop on Sample Preparation, 2003.

K.S. SUSLICK, P.F. SCHUBERT, J.W. GOODALE, Chemical dosimetry of ultrasonic cavitation, p. 612–616, 1990.

LIU, L.; KONG, Y.; XU, H.; LI, J. P.; DONG, J.X.; LIN, Z. Ionothermal synthesis of a three-dimensional zinc phosphate with DFT topology using unstable deep-eutectic sol-vent as template-delivery agent. Microporous and Mesoporous Materials, p. 624-628, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas. Instituto Plantarum, v. 01, p. 512, 2006.

MAUGERI Z.; DOMÍNGUEZ P. M., Novel choline-chloride-based deep-eutectic-solvents with renewable hydrogen bond donors: levulinic acid and sugar-based polyols, Journal RSC Advances, 2012.

MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: antioxidantes naturais da família lamiaceae. Aplicação em Produtos Alimentícios. Brazilian Journal of Food Technology, v. 10, n. 2, p. 96-103, 2007.

MAZZA, G.; MINIATI, E. Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. 6. ed., p. 362, 1993.

MEDEIROS, M. L. DE. Extrato de Alecrim: Um antioxidante eficiente para uso no biodiesel. , 2013.

PANIWNYK, L.; CAI, H.; ALBU, S.; MASON, T. J.; COLE, R. Ultrasonics Sonochemistry The enhancement and scale up of the extraction of anti-oxidants from *Rosmarinus officinalis* using ultrasound q. **Ultrasonics - Sonochemistry**, v. 16, n. 2, p. 287–292, 2009. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2008.06.007>>.

PARK, H. E.; TANG, B.; ROW, K. H. Application of deep eutectic solvents as additives in ultrasonic extraction of two phenolic acids from *Herba artemisiae scopariae*. Anal. Lett, 2014.

PENG, X.; DUAN, M.-H.; YAO, X.-H.; ZHANG, Y.-H.; ZHAO, C.-J.; ZU, Y.-G.; FU, Y.-J. Green extraction of five target phenolic acids from *Lonicerae japonicae* Flos with deep eutectic solvent. Sep. Purif. Technol, 2016.

PENTEADO, J. G.; CECY, A. T. *Rosmarinus officinalis* L. Labiatae (Lamiaceae): UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. , p. 1–7, 2006.

PINELO, M.; SINEIRO, J.; NEZ, 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, 2006.

ROCKENBACH I. I.; SILVA G. L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E., M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 238-244, 2008.

RUESGAS-RAMON, M.; FIGUEROA-ESPINOZA, M. C.; DURAND, E. Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for phenolic compounds extraction: overview, challenges, and opportunities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. acs.jafc.7b01054, 2017. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.7b01054>>.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, S. A. Colorimetric of total phenolics with phosphomolibic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology & Viticulture, California, US*, v. 16, p. 144-158, 1965.

SHAHBAZ, K.; MJALLI, F.S.; HASHIM, M.A.; ALNASHEF, I. M. Using Deep eutectic solvents for the removal of glycerol from palm oil-based biodiesel. *Journal of Applied Sciences*, p. 3349-3354, 2010.

TABARAKI, R.; NATEGHI, A. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 18, n. 6, p. 1279–1286, 2011.

THORSEN, M. A.; HILDEBRANDT, K. S. Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts: Aspects of accurate quantification. **Journal of Chromatography A**, v. 995, n. 1–2, p. 119–125, 2003.

XIU, B.; YAN, D.; BAI, Y.; XIE, J.; CAO, Y.; LIAO, D.; LIN, L. Determination of phenolic acids in *Prunella vulgaris* L.: a safe and green extraction method using alcohol-based deep eutectic solvents. *Anal. Methods*, 2015.

YADAV, A.; TRIVEDI, S.; RAI, R.; PANDEY, S. Densities and dynamic viscosities of (choline chloride + glycerol) deep eutectic solvent and its aqueous mixtures in the temperature range. *Fluid Phase Equilibria*, v. 367, p. 135-142, 2014.

Y.E. PRIMO, B.F. LAFUENTTE, R.P. PEREZ, C.I. ORIOL, Y.E. JORRO, Spanish Patent, 1973.

ZHANG, H.; TANG, B.; ROW, K. Extraction of catechin compounds from green tea with a new green solvent. *Chem. Res. Chinese Univ.*, 2014.

