

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
GRAZIELLE DE OLIVEIRA

EMPREGO DE SOLVENTES VERDES NA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS  
BIOATIVOS DA *CURCUMA LONGA* L.: DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE E  
MODELAGEM TERMODINÂMICA

CURITIBA

2022

GRAZIELLE DE OLIVEIRA

EMPREGO DE SOLVENTES VERDES NA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS  
BIOATIVOS DA *CURCUMA LONGA* L.: DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE E  
MODELAGEM TERMODINÂMICA

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Marcos R. Mafra

CURITIBA

2022

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

---

- O48e Oliveira, Grazielle de  
Emprego de solventes verdes na obtenção de compostos bioativos da *curcuma longa* L.: determinação da solubilidade e modelagem termodinâmica [recurso eletrônico] / Grazielle de Oliveira. – Curitiba, 2022.
- Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos., Setor de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química.
- Orientador: Prof. Dr. Marcos Rogério Mafra
1. Extração por solventes. 2. Curcumina. 3. Quercetina. 4. Ácido gálico. I. Universidade Federal do Paraná. II. Mafra, Marcos Rogério. III. Título.

CDD: 660.29482

---

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **GRAZIELLE DE OLIVEIRA** intitulada: **Emprego de solventes verdes na obtenção de compostos bioativos da *Curcuma longa* L.: determinação da solubilidade e modelagem termodinâmica**, sob orientação do Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO MAFRA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

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

CURITIBA, 22 de Março de 2022.

Assinatura Eletrônica

23/03/2022 14:15:09.0

MARCOS ROGÉRIO MAFRA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

23/03/2022 12:30:52.0

PAULA BECKER PERTUZATTI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO)

Assinatura Eletrônica

23/03/2022 10:00:32.0

MARIA LUCIA MASSON

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

23/03/2022 14:55:32.0

MARIANA CONCEIÇÃO DA COSTA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS)

Assinatura Eletrônica

23/03/2022 09:52:41.0

FERNANDA VITÓRIA LEIMANN

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ - UTFPR)

À minha família. Minha base, em especial meu pai, Ivanir, minha mãe, Célia e minha irmã, Anielle.

## **AGRADECIMENTOS**

Deus, primeiramente agradeço pela vida. Saúde e bênçãos sobre mim derramadas, pela força e por guiar meu destino. Por colocar no meu caminho as pessoas certas nas horas certas.

Ao meu orientador, professor Marcos Mafra, pela ajuda na construção e desenvolvimento deste trabalho, pela oportunidade e por confiar em mim. Por todo o crescimento e ensinamentos proporcionados, que pretendo sempre passar adiante.

À minha família, em especial aos meus pais, Ivanir e Célia, por me oferecerem a oportunidade de estudar, não medindo esforços para que isso acontecesse. Pai e mãe, por toda a conversa e suporte que me deram, mesmo longe eu nunca estive sozinha.

À minha irmã, Anielle, por todo o apoio e confiança em mim depositados. Pela parceria que temos desde criança.

À minha tia, Geni, e minhas primas, a Tati, Neiva, Rose e Gabi e em especial minha priminha, Larissa, por ter me ensinado tanto em momentos difíceis.

Aos meus amigos do LATOS por tantas conversas, orações e risadas. Em especial a Fabi, Carol, Tâmis, Danielle, Dani Olegário, José, Fernando, Carlinhos, Karina e Letícia, pela parceria.

À todas as pessoas especiais que conheci nessa caminhada, pessoas que levarei para minha vida, a Naty, Rafa, Felipe, Elsa, Diogo, Silvana, Edilson, Cláudia, Janete, Ju e a Indi.

À Universidade Federal do Paraná, o Departamento de Engenharia Química e o Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos pela estrutura e oportunidade, a todos os professores e a CAPES pelo aporte financeiro.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado, além disso, que estiveram ao meu lado e que acreditaram em mim, muito obrigada!!!

Nada na vida deve ser temido, é apenas para ser entendido. Agora é a hora de entender mais, para que possamos ter menos medo.

(Marie Curie).

## RESUMO

Diversas pesquisas são realizadas com a finalidade de desenvolver metodologias para extração e separação de compostos bioativos. Esse interesse se dá pela ampla aplicação em produtos alimentícios, fármacos e cosméticos, a fim de promover a saudabilidade e o bem-estar da população. Desde sua introdução em 2003, os solventes eutéticos profundos (DES do inglês - *deep eutectic solvent*) vêm sendo aplicados como agentes extratores desses compostos, uma vez que são preparados de forma simples, possuem baixo custo, além de apresentarem baixa ou nenhuma toxicidade. Os DES são obtidos por duas ou mais substâncias capazes de formar ligações de hidrogênio e o estudo da interação dessas moléculas, bem como do composto de interesse auxilia na eficiência da extração. Diante deste contexto, esse trabalho tem como objetivo o emprego de solventes e processos mais compatíveis com o meio ambiente, para obtenção de compostos bioativos presentes na *Curcuma longa* L. (rizoma, folha e flor). Para isso, o trabalho avaliou a bioatividade dos extratos a partir de análises *in vitro* (capacidade antioxidante, fenólicos totais, atividade antimicrobiana, quelante de ferro, efeito na atividade enzimática das colinesterases e  $\alpha$ -amilases) e *in vivo* (avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade em células de *Allium cepa* L.). De forma a auxiliar a etapa de extração, conferindo esse maior embasamento teórico à seleção dos solventes de extração, foram avaliados neste trabalho o comportamento de fases (equilíbrio sólido-líquido) tanto experimental quanto por meio dos modelos preditivos tipo COSMO (*COnductor-like Screening Model*), em soluções aquosas de DES e compostos bioativos (curcumina, quercetina, cafeína e ácido gálico). Na etapa de otimização do processo de extração, os seguintes parâmetros foram selecionados: dois DES hidrofóbicos (mentol + ácido láurico e mentol + ácido acético), temperatura de 45 °C e tempos de 2 até 3 horas. Os extratos apresentaram atividades biológicas em todas as análises testadas e não foram tóxicos em células de *A. cepa*. A curcumina, extratos e DES apresentaram alta capacidade de inibir a atividade da  $\alpha$ -amilase, sem gerar degradação na sua estrutura. O comportamento de fases revelou que a adição de água ao solvente promove o aumento da solubilidade da curcumina e da quercetina. Para o ácido gálico, o cloreto de colina proporcionou efeito hidrótopo, comportamento esse registrado pela primeira vez na literatura. A cafeína demonstrou ser mais solúvel em água pura do que nestes solventes. Os modelos tipo COSMO auxiliaram no entendimento da interação desses compostos bem como na seleção dos solventes. Os resultados obtidos demonstram que os DES selecionados apresentam alta capacidade de extração dos compostos bioativos presente na *Curcuma longa* L., sendo uma alternativa ao uso de solventes orgânicos. As atividades biológicas e a não toxicidade indicam que os extratos podem ser empregados no desenvolvimento de produtos nas áreas de fármacos, cosméticos e principalmente de alimentos.

**Palavras-chave:** Otimização de extração; Atividade biológica; Solventes Eutéticos Profundos; Curcumina, quercetina, ácido gálico e cafeína; Modelo COSMO.

## ABSTRACT

Several researches are carried out with the aim of developing methodologies for extraction and separation of bioactive compounds. This interest is due to the wide application in food products, pharmaceuticals and cosmetics, in order to promote the healthiness and well-being of the population. Since its introduction in 2003, deep eutectic solvents (DES) have been applied as extracting agents for these compounds, since they are simply prepared, have low cost, and have low or no toxicity. DES are obtained by two or more substances capable of forming hydrogen bonds and the study of the interaction of these molecules, as well as with the compound of interest, helps in the extraction efficiency. Given this context, this work aims to use solvents and processes more compatible with the environment, to obtain bioactive compounds present in *Curcuma longa* L. (rhizome, leave and flower). For this, the work evaluated the bioactivity of the extracts from *in vitro* analyzes (antioxidant capacity, total phenolics, antimicrobial activity, iron chelator, effect on the enzymatic activity of cholinesterase's and  $\alpha$ -amylases) and *in vivo* (assessment of cytotoxicity and genotoxicity in *Allium cepa* L. cells). In order to help the extraction step, giving this greater theoretical basis to the selection of extraction solvents, the phase behavior (solid-liquid equilibrium) was evaluated in this work, both experimentally and by means of COnductor-like Screening Model (COSMO) in aqueous solutions of DES and bioactive compounds (curcumin, quercetin, caffeine and gallic acid). In the extraction process optimization step, the following parameters were selected: two hydrophobic DES (menthol + lauric acid and menthol + acetic acid), temperature of 45 °C and times of 2 to 3 hours. The extracts showed biological activities in all analyzes tested and were not toxic to *A. cepa* cells. Curcumin, extracts and DES showed a high capacity to inhibit the activity of  $\alpha$ -amylase, without causing degradation in its structure. The phase behavior revealed that the addition of water to the solvent increases the solubility of curcumin and quercetin. For gallic acid, choline chloride provided a hydrotrope effect, a behavior recorded for the first time in the literature. Caffeine has been shown to be more soluble in pure water than in these solvents. COSMO-type models helped in understanding the interaction of these compounds as well as in the selection of solvents. The results obtained demonstrate that the selected DES have a high extraction capacity of the bioactive compounds present in *Curcuma longa* L., being an alternative to the use of organic solvents. The biological activities and non-toxicity indicate that the extracts can be used in the development of products in the areas of pharmaceuticals, cosmetics and especially food.

**Key-words:** Extraction optimization; Biological activity; Deep Eutectic Solvents; Curcumin, quercetin, gallic acid and caffeine; COSMO model; Solubility.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DO BHA, BHT, PG E TBHQ.....	28
FIGURA 2 – IMAGEM ILUSTRATIVA DA PLANTA <i>CURCUMA LONGA</i> L.....	30
FIGURA 3 – ESTRUTURA E FÓRMULA QUÍMICA DOS PIGMENTOS DA CURCUMA: BISDEMETOXICURCUMINA, DEMETOXICURCUMINA E CURCUMINA .....	32
FIGURA 4 – DIAGRAMA DE FASES EQUILÍBRIO SÓLIDO-LÍQUIDO (ESL) DE UMA SOLUÇÃO IDEAL E DE UM DES .....	38
FIGURA 5 – EXEMPLO DA FORMAÇÃO DE UM SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO (CLORETO DE COLINA + ETILENO GLICOL) .....	39
FIGURA 6 – PUBLICAÇÕES RELACIONADAS AOS DES DE 2004 ATÉ 2022.....	42
FIGURA 7 – RIZOMA, FOLHA E FLOR DE <i>CURCUMA LONGA</i> L. UTILIZADAS NESTE TRABALHO .....	44
FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA PLANTA <i>CURCUMA LONGA</i> L. E APLICAÇÃO DOS EXTRATOS	47
FIGURA 9 - CAPTURA DO DPPH• PELA AÇÃO DE UM ANTIOXIDANTE .....	49
FIGURA 10 - REDUÇÃO DE FE (III) À FE (II) NO COMPLEXO TPTZ .....	49
FIGURA 11 - ANÁLISE DE DPPH: (■) RIZOMAS; (■) FOLHAS E (■) FLORES DE CURCUMA LONGA L. EM SEIS SOLVENTES, USANDO UAE POR 1 HORA A 35 °C .....	64
FIGURA 12 - ANÁLISE DE FRAP: (■) RIZOMAS; (■) FOLHAS E (■) FLORES DE CURCUMA LONGA L. EM SEIS SOLVENTES, USANDO UAE POR 1 HORA A 35 °C .....	64
FIGURA 13 - ANÁLISE DE FLAVONOIDES: (■) RIZOMAS; (■) FOLHAS E (■) FLORES DE CURCUMA LONGA L. EM SEIS SOLVENTES, USANDO UAE POR 1 HORA A 35 °C.....	65
FIGURA 14 - ANÁLISE DE DPPH: (■) RIZOMAS; (■) FOLHAS E (■) FLORES DE CURCUMA LONGA L. USANDO UAE POR 1 HORA, DOIS SOLVENTES E 4 TEMPERATURAS.....	67

FIGURA 15 - ANÁLISE DE FRAP: (■) RIZOMAS; (■) FOLHAS E (■) FLORES DE <i>CURCUMA LONGA</i> L. USANDO UAE POR 1 HORA, DOIS SOLVENTES E 4 TEMPERATURAS.....	68
FIGURA 16 - ANÁLISE DE FLAVONOÍDES: (■) RIZOMAS; (■) FOLHAS E (■) FLORES DE <i>CURCUMA LONGA</i> L. USANDO UAE POR 1 HORA, DOIS SOLVENTES E 4 TEMPERATURAS .....	68
FIGURA 17 - ANÁLISE DE DPPH: (■) RIZOMAS; (■) FOLHAS E (■) FLORES DE <i>CURCUMA LONGA</i> L. USANDO UAE, DOIS SOLVENTES, 45 °C E SEIS TEMPOS .....	69
FIGURA 18 - ANÁLISE DE FRAP: (■) RIZOMAS; (■) FOLHAS E (■) FLORES DE <i>CURCUMA LONGA</i> L. USANDO UAE, DOIS SOLVENTES, 45 °C E SEIS TEMPOS .....	70
FIGURA 19 - ANÁLISE DE FLAVONOÍDES: (■) RIZOMAS; (■) FOLHAS E (■) FLORES DE <i>CURCUMA LONGA</i> L. USANDO UAE, DOIS SOLVENTES, 45 °C E SEIS TEMPOS .....	70
FIGURA 20 - A) SCREE PLOT DE AUTOVALORES; B) DISTÂNCIA DE MAHALANOBIS DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS CONSIDERANDO TRÊS COMPONENTES PRINCIPAIS .....	72
FIGURA 21 - GRÁFICO DE CARGAS DE PCA A PARTIR DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE DPPH, FRAP E FLAVONOÍDES E AS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS .....	72
FIGURA 22 - GRÁFICO DE PONTUAÇÃO DE PC1 VERSUS PC2 A PARTIR DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE DPPH, FRAP E FLAVONOÍDES E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS .....	73
FIGURA 23 – QUELAÇÃO DO Fe <sup>2+</sup> EDTA mg.mL <sup>-1</sup> E % DE QUELAÇÃO EM EXTRATOS DE: (■) RIZOMAS; (■) FOLHAS E (■) FLORES DE <i>CURCUMA LONGA</i> L. E DES.....	77
FIGURA 24 - PLACAS DE ANÁLISE ANTIMICROBIANAS: a) FOLHA <i>C. perfringens</i> , Men:Ac ESQUERDA E Men:Lac DIREITA; b) RIZOMA PARA <i>E. coli</i> , Men:Ac ESQUERDA E Men:Lac DIREITA; c) Men:Ac ESQUERDA E Men:Lac DIREITA PARA <i>Listéria</i> ; d) Men:Ac ESQUERDA E Men:Lac DIREITA PARA <i>Salmonella</i> sp. ....	78
FIGURA 25 – DIVISÃO CELULAR EM CÉLULAS DE <i>A. CEPA</i> L. EXPOSTAS A EXTRATOS DE DES E RIZOMA DE <i>CURCUMA LONGA</i> L.....	83

FIGURA 26 - INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE A): $\alpha$ -AMILASE PANCREÁTICA SUÍNA E B): $\alpha$ -AMILASE SALIVAR HUMANA; DOS EXTRATOS DE (■) RIZOMAS; (■) FOLHAS; (■) FLORES DE CURCUMA LONGA L. E (■) DES.....	87
FIGURA 27 - ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA REFERENTES A: (A) ESPECTROS DE EMISSÃO NA PRESENÇA DE CURCUMINA (CONCENTRAÇÕES QUE VARIAM DE 5,6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ATÉ 33,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ); (B) GRÁFICO DE STERN-VOLMER DESCRIVENDO A EXTINÇÃO CAUSADA PELA CURCUMINA; (C) ESPECTROS DE EMISSÃO OBTIDOS NA PRESENÇA MEN:LAC (CONCENTRAÇÃO DE 0,6X10 <sup>-9</sup> ATÉ 3,3X10 <sup>-9</sup> L.mL <sup>-1</sup> DE SOLUÇÃO); (D) GRÁFICO DE STERN-VOLMER DESCRIVENDO A EXTINÇÃO NA PRESENÇA DE MEN:LAC EXTRATO. A INTENSIDADE DAS EMISSÕES DE FLUORESCÊNCIA FOI REGISTRADA EM 280 nm, E A EMISSÃO MÁXIMA OCORREU EM 341 nm.....	89
FIGURA 28 - ESPECTRO UV DO DC DA $\alpha$ -AMILASE PANCREÁTICA SUÍNA NA PRESENÇA DE 33,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ DE CURCUMINA E 0,6X10 <sup>-3</sup> $\mu\text{L/mL}$ DE MEN:LAC EXTRATO .....	90
FIGURA 29 - CINÉTICA ENZIMÁTICA DA HIDRÓLISE DO AMIDO PELA AÇÃO DA $\alpha$ -AMILASE PANCREÁTICA SUÍNA OBTIDA POR CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA. (A) TERMOGRAMA PARA CONVERSÃO DE AMIDO DE BATATA (200 $\mu\text{L}$ ; 10 mg/mL) APÓS ADIÇÃO DA $\alpha$ -AMILASE PANCREÁTICA SUÍNA (35 $\mu\text{L}$ ; 0,010 mg/mL). (B) GRÁFICO DE MICHAELIS-MENTEN CONVERTIDO DO TERMOGRAMA .....	91
FIGURA 30 - POSE DE CURCUMINA ANCORADA NO SÍTIO ATIVO DA $\alpha$ -AMILASE PANCREÁTICA SUÍNA OBTIDA EM AUTODOCK (AZUL), MOLEGRO (VERDE) E VINA (ROXO).....	94
FIGURA 31 - A CURCUMINA ANCORADA NO SÍTIO ATIVO DA $\alpha$ -AMILASE PANCREÁTICA SUÍNA. (A) CONJUNTO DE POSES OBTIDO NO PROGRAMA MOLEGRO E (B) O RESPECTIVO DIAGRAMA DE INTERAÇÃO 2D GERADO NO PROGRAMA POSEVIEW (STIERAND et al., 2006). .....	94
FIGURA 32 - CONJUNTO DE POSES COM MELHORES PONTUAÇÕES OBTIDAS NO PROGRAMA MOLEGRO PARA: (A) MENTOL E (B) ÁCIDO LÁTICO .....	95
FIGURA 33 - SOLUBILIDADE ( $\ln S/S_0$ ) DA QUERCETINA EM SOLUÇÃO AQUOSA DE: (■) DES; (●) [Ch]Cl + XILITOL; (▲) [Ch]Cl E (◆) XILITOL. AS LINHAS TRACEJADAS FORAM OBTIDAS PELO SPLINE.....	98

FIGURA 34 - SOLUBILIDADE ( $\ln S/S_0$ ) DA CURCUMINA EM SOLUÇÃO AQUOSA DE: (■) DES; (●) [Ch]Cl + XILITOL; (▲) [Ch]Cl E (◆) XILITOL. AS LINHAS TRACEJADAS FORAM OBTIDAS PELO SPLINE .....	99
FIGURA 35 - SOLUBILIDADE ( $\ln S/S_0$ ) DO ÁCIDO GÁLICO EM SOLUÇÃO AQUOSA DE: (■) DES; (●) [Ch]Cl + XILITOL; (▲) [Ch]Cl E (◆) XILITOL. AS LINHAS TRACEJADAS FORAM OBTIDAS PELO SPLINE .....	100
FIGURA 36 - SOLUBILIDADE ( $\ln S/S_0$ ) DE: (A) QUERCETINA, (B) CURCUMINA E (C) ÁCIDO GÁLICO EM UMA SOLUÇÃO AQUOSA DE (■) DES E (●) [Ch]Cl + XILITOL. AS LINHAS FORAM OBTIDAS PELO SPLINE .....	104
FIGURA 37 - PERFIS $\sigma$ E DENSIDADES DE CARGA SUPERFICIAL INDUZIDA EM 3D OBTIDOS DO COSMO-RS DAS MOLÉCULAS INVESTIGADAS NESTE TRABALHO.....	106
FIGURA 38 – PREDIÇÃO DO $\ln \gamma_{biomoleculas}$ A) QUERCETINA; B) CURCUMINA E C) ÁCIDO GÁLICO, POR MEIO DO COSMO-SAC E COSMO-RS, EM DIFERENTES SISTEMAS, A 298,2 K.....	108
FIGURA 39 - SOLUBILIDADE PREVISTA ( $\ln S/S_0$ ) POR COSMO-SAC DE: A) QUERCETINA E B) CURCUMINA; E COSMO-RS DE: C) QUERCETINA E D) CURCUMINA EM SOLUÇÕES AQUOSAS DE: (—) DES; (—) [Ch]Cl E (—) XILITOL .....	110
FIGURA 40 - SOLUBILIDADE PREVISTA ( $\ln S/S_0$ ) COSMO-SAC DO ÁCIDO GÁLICO EM SOLUÇÕES AQUOSAS DE: (—) DES; (—) [Ch]Cl E (—) XILITOL.....	111
FIGURA 41 – SOLUBILIDADE ( $\ln S/S_0$ ) DO ÁCIDO GÁLICO EM: (■) DES – DADOS EXPERIMENTAIS; COSMO-SAC EM SOLUÇÕES AQUOSAS DE: (—) DES; (—) [Ch]Cl E (—) XILITOL.....	112
FIGURA 42 – SOLUBILIDADE RELATIVA ( $\ln S/S_0$ ), DA CURCUMINA EM DIFERENTES SOLUÇÕES AQUOSAS EM TEMPERATURA DE 298,15 K.....	115
FIGURA 43 – CINÉTICA DE DISSOLUÇÃO DA CURCUMINA EM: (--■--) DES2; (--●--)-) DES2 + 20% DE ÁGUA (m/m) e (--▲--) DES2 + 80% DE ÁGUA (m/m) .....	119
FIGURA 44 - SOLUBILIDADE RELATIVA ( $\ln S/S_0$ ), DO ÁCIDO GÁLICO EM DIFERENTES SOLUÇÕES AQUOSAS EM TEMPERATURA DE 298,15 K.....	120
FIGURA 45 - SOLUBILIDADE RELATIVA ( $\ln S/S_0$ ), DA CAFEÍNA EM DIFERENTES SOLUÇÕES AQUOSAS EM TEMPERATURA DE 298,15 K .....	121

FIGURA 46 - SOLUBILIDADE RELATIVA ( $\ln S/S_0$ ), DA CAFEÍNA EM DIFERENTES SOLUÇÕES AQUOSAS EM TEMPERATURA DE 298,15 K .....	122
FIGURA 47 – SOLUÇÕES AQUOSAS QUE GERARAM EFEITO HIDROTROPO NO ÁCIDO GÁLICO .....	123
FIGURA 48 – PERFIL SIGMA E SUPERFÍCIE 3D DA CURCUMINA, ÁCIDO GÁLICO E CAFEÍNA (EMPREGANDO O COSMO-RS).....	124
FIGURA 49 - PERFIL SIGMA E SUPERFÍCIE 3D DO CLORETO DE COLINA ([Ch]Cl), ETILENO GLICOL, 1,2-PROPANODIOL, XILITOL E ÁGUA (EMPREGANDO O COSMO-RS) .....	125

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO RIZOMA DE CURCUMA SECO E <i>IN NATURA</i> CULTIVADOS EM MINAS GERAIS (MG) E EM SÃO PAULO (SP). .....	31
TABELA 2 – ABREVIÇÃO, MISTURAS E FRAÇÃO MOLAR DOS DES UTILIZADOS .....	45
TABELA 3 – REAGENTES UTILIZADOS NO PREPARO DOS DES, ESTRUTURA MOLECULAR, MASSA MOLAR, NÚMERO CAS, PUREZA (%) E FORNECEDOR.	46
TABELA 4 – NOME, FÓRMULA E ESTRUTURA QUÍMICA, NÚMERO-CAS E PUREZA DAS BIOMOLÉCULAS AVALIADAS .....	59
TABELA 5 - EXECUÇÕES EXPERIMENTAIS AVALIADAS POR PCA. TIPO DE AMOSTRA: 1 - RIZOMA; 2 - FOLHA; 3 - FLOR. SOLVENTE: 1 – Men:Lac; 2 – Men:Lau; 3 – Men:Ac; 4 – [Ch]Cl:Lac; 5 – [Ch]Cl:Ac; 6 – EtOH.....	74
TABELA 6 - CAPACIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE DES E RIZOMA, FOLHA E FLOR DE CURCUMA LONGA L. E DES PURO.....	79
TABELA 7 - ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ACETIL (AChE) E BUTIRILCOLINESTERASE (BChE) DE EXTRATOS DE DES E RIZOMA, FOLHA E FLOR DE CURCUMA LONGA L. E DES PURO (TODOS OS EXTRATOS FORAM DILUÍDOS 100X EM METANOL) .....	81
TABELA 8 - ÍNDICES MITÓTICOS (%) E ÍNDICES DE ALTERAÇÕES CELULARES OBSERVADOS EM MERISTEMAS DE RAÍZES DE A. CEPA EXPOSTOS A EXTRATOS DE DES DE RIZOMA, FOLHA E FLOR DE CURCUMA LONGA L. E DES PURO .....	84
TABELA 9 - CONSTANTE DE VELOCIDADE CATALÍTICA ( $K_{cat}$ ), CONSTANTE DE MICHAELIS ( $K_M$ ) E CALOR DE DECOMPOSIÇÃO DO SUBSTRATO ( $\Delta H$ ) PARA CONVERSÃO DO AMIDO DE BATATA POR $\alpha$ -AMILASE SUÍNA OBTIDA POR CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA .....	92
TABELA 10 - PONTUAÇÕES MÉDIAS PARA COMPOSTOS AVALIADOS NAS SIMULAÇÕES DE DOCKING CONSIDERANDO A $\alpha$ -AMILASE PANCREÁTICA SUÍNA COMO O ALVO .....	93

TABELA 11 - SOLUBILIDADE (S, g.L <sup>-1</sup> ) DA QUERCETINA, CURCUMINA E ÁCIDO GÁLICO EM SOLUÇÕES DE ÁGUA + ADITIVOS A 298,2 K E PRESSÃO ATMOSFÉRICA (91 kPa) <sup>1</sup> .....	102
TABELA 12 - CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE <i>lnybiomoleculas</i> <sup>∞</sup> PREDITAS POR COSMO-SAC E COSMO-RS, EM DIFERENTES SOLVENTES .....	107
TABELA 13 - NOME, NÚMERO CAS E PROPRIEDADES DE FUSÃO PARA OS COMPOSTOS APLICADOS PARA PREVISÃO DE SOLUBILIDADE.....	109
TABELA 14 – SOLUBILIDADE (g.L <sup>-1</sup> ) DA CURCUMINA, ÁCIDO GÁLICO E CAFEÍNA EM ÁGUA COM DIFERENTES ADITIVOS, EM TEMPERATURA DE 298,15 K.....	117
TABELA 15 - SOLUBILIDADE (g.L <sup>-1</sup> ) DA CAFEÍNA EM ÁGUA COM DIFERENTES ADITIVOS, EM TEMPERATURA DE 298,15 K .....	118

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 VANTAGENS E LIMITAÇÕES DAS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO SOXHLET, SUPERCRÍTICA, ULTRASSOM E MICRO-ONDAS.....	33
--	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	– Graus Celsius
AChE	– Acetil colinesterase
BChE	– Butiril colinesterase
A• -	– Radical inerte
AH	– Antioxidantes
BHA	– (2,3-terc-butil-4-hidroxianisol)
BHT	– (2,6-diterc-butil-p-creso)
COSMO	– <i>Conductor like Screening Model</i>
DES	– <i>Deep Eutectic Solvents</i>
DPPH	– 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EtOH	– Etanol
FRAP	– <i>Ferric Reduction Antioxidant Power</i>
G <sup>E</sup>	– Energia de Gibbs de excesso
GRAS	– <i>Generally recozined as safe</i>
HBA	– <i>Hydrogen Bond Acceptor</i>
HBD	– <i>Hydrogen Bond Donor</i>
HPLC	– Cromatografia líquida de alta eficiência
K	– Kelvin
log ( <i>K<sub>ow</sub></i> )	– Coeficiente de partição octanol/água
Men:Ac	– Mentol + Ácido Acético
Men:Lac	– Mentol + Ácido Láctico
Men:Lau	– Mentol + Ácido Láurico
[Ch]Cl:Ac	– Cloreto de Colina + Ácido Acético
[Ch]Cl:Lac	– Cloreto de Colina + Ácido Láctico
NO•	– Óxido nítrico
NOO•	– Dióxido de nitrogênio
O <sub>2</sub> •-	– Íon superóxido
OH•	– Radicais hidroxilas
PCA	– <i>Principal Component Analyse</i>
RO•	– Radicais alcoxila
ROO•	– Radicais peroxila
Rpm	– Rotações por minuto
TBHQ	– Tercbutilhidroquinona
TPTZ	– 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine
γ	– Coeficiente de atividade

# SUMÁRIO

<b>PARTE I</b> .....	<b>21</b>
<b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
1.1 INTRODUÇÃO .....	22
1.2 OBJETIVOS .....	25
1.2.1 Objetivo Geral .....	25
1.2.2 Objetivos específicos .....	25
<b>CAPÍTULO 2 – REVISÃO DA LITERATURA E ESTADO DA ARTE</b> .....	<b>27</b>
2.1 REVISÃO DA LITERATURA .....	27
2.2 COMPOSTOS BIOATIVOS .....	27
2.3 ANTIOXIDANTES .....	28
2.4 <i>CURCUMA LONGA L.</i> .....	29
2.4.1 Composição química da <i>Curcuma longa L.</i> .....	30
2.5 MÉTODOS CONVENCIONAIS PARA EXTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTES .....	32
2.6 SOLVENTES EMPREGADOS NA EXTRAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES .....	35
2.6.1 Solventes Verdes .....	35
2.7 SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS (DES) .....	37
2.8 APLICAÇÃO DOS DES PARA EXTRAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS .....	41
<b>CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
3.1 PREPARO DAS AMOSTRAS DE RIZOMA, FOLHA E FLOR DA <i>CURCUMA LONGA L.</i> .....	44
3.2 PREPARO DOS SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS (DES) .....	45
3.3.1 Extração sólido-líquido assistida por ultrassom .....	47
3.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E FLAVONOIDES TOTAIS .....	48
3.4.1 Análise de Componentes Principais (PCA) .....	50
3.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS .....	50

3.5.1 Atividade quelante do íon de Ferro <sup>2+</sup> .....	51
3.5.2 Atividade antimicrobiana.....	51
3.5.3 Análise <i>in vitro</i> das atividades enzimáticas da Acetilcolinesterase (AChE) e Butirilcolinesterase (BChE).....	52
3.5.4 Teste <i>in vivo</i> da citotoxicidade e genotoxicidade em células do meristema da raiz de <i>Allium cepa</i> L.....	53
3.5.5 Avaliação <i>in vitro</i> de inibição da $\alpha$ -amilase salivar humana e pancreática suína.....	53
3.6 INTERAÇÃO DA $\alpha$ -AMILASE PANCREÁTICA SUÍNA COM A CURCUMINA E EXTRATO .....	54
3.6.1 Fluorescência .....	55
3.6.2 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC).....	55
3.6.3 Dicroísmo circular (DC).....	56
3.6.4 Docking Molecular .....	57
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
3.8 SOLUBILIDADE DE BIOMÓLECUAS EM SOLUÇÕES AQUOSAS.....	58
3.8.1 Determinação da Solubilidade .....	59
3.8.2 Modelos tipos COSMO ( <i>Conductor like Screening Model</i> ) .....	60
3.8.3 Cinética de dissolução da curcumina em soluções aquosas.....	61
<b>PARTE II .....</b>	<b>62</b>
<b>CAPÍTULO 4 – Estudo do processo de extração dos compostos bioativos da <i>Curcuma longa</i> L. empregando os DES<sup>1</sup> .....</b>	<b>63</b>
4.1 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NA <i>CURCUMA LONGA</i> L. (RIZOMA, FOLHA E FLOR) .....	63
4.1.1 Efeito do Solvente.....	63
4.1.2 Efeito da Temperatura .....	66
4.1.3 Efeito do Tempo.....	69
4.2 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA).....	71

4.3 ANÁLISES BIOLÓGICAS .....	76
4.3.1 Atividade quelante do íon de Ferro <sup>2+</sup> .....	76
4.3.2 Atividade antimicrobiana.....	77
4.3.2 Análise <i>in vitro</i> das atividades enzimáticas da Acetilcolinesterase (AChE) e Butirilcolinesterase (BChE).....	80
4.3.3 Teste <i>in vivo</i> da citotoxicidade e genotoxicidade em células do meristema da raiz de <i>Allium cepa</i> L.....	82
4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	85
<b>CAPÍTULO 5 - Efeito do extrato de <i>Curcuma longa</i> L. e da curcumina na estrutura e atividade da <math>\alpha</math>-amilase pancreática suína<sup>2</sup>.....</b>	<b>86</b>
5.1 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA INIBIÇÃO DA $\alpha$ -AMILASE PANCREÁTICA SUÍNA E SALIVAR HUMANA .....	86
5.2 FLUORESCÊNCIA.....	88
5.3 DICROÍSMO CIRCULAR (DC).....	89
5.4 CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA (ITC).....	91
5.5 DOCKING MOLECULAR .....	92
5.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	95
<b>CAPÍTULO 6 – Determinação da solubilidade de biomoléculas em meio aquoso usando DES e emprego de modelos tipo COSMO<sup>3</sup>.....</b>	<b>97</b>
6.1 SOLUBILIDADE DA QUERCETINA, CURCUMINA E DO ÁCIDO GÁLICO ....	97
6.2 LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO NO DES .....	103
6.3 EMPREGO DO MODELO COSMO .....	105
6.3.1 Perfis Sigma .....	105
6.3.2 Determinação da solubilidade utilizando o modelo COSMO .....	107
6.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	112
<b>CAPÍTULO 7 – Solubilidade de biomoléculas em soluções aquosas de DES: Estudo experimental e <i>in silico</i> empregando COSMO-RS<sup>4</sup> .....</b>	<b>114</b>
7.1 SOLUBILIDADE DA CURCUMINA, ÁCIDO GÁLICO E CAFEÍNA.....	114

7.1.2 Dados da solubilidade e cinética de dissolução da curcumina .....	114
7.1.2 Dados de solubilidade do ácido gálico e da cafeína .....	120
7.2 HIDROTROPIA .....	122
7.3 COSMO-RS .....	124
7.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	126
<b>PARTE III .....</b>	<b>128</b>
<b>CAPÍTULO 8 – Conclusões, Desafios Futuros e Produção Científica .....</b>	<b>129</b>
8.1 CONCLUSÃO .....	129
8.2 DESAFIOS FUTUROS.....	131
8.3 PRODUÇÃO CIENTÍFICA .....	132
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>135</b>

## PARTE I

*Introdução, Estado da Arte, Objetivos e Descrição Experimental*

---

## CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

---

### 1.1 INTRODUÇÃO

Os compostos bioativos com alto potencial antioxidante são metabólitos sintetizados por plantas que, devido às suas propriedades nutracêuticas, podem ser extraídos e empregados em alimentos processados, nas indústrias farmacêutica e de cosméticos. Há diversas evidências que esses compostos apresentam potencialidade para serem utilizados pelos seres humanos a fim de promover saúde e reduzir os riscos de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, câncer e Alzheimer.

Os antioxidantes sintéticos, como o BHA (2,3-terc-butil-4-hidroxianisol) e o BHT (2,6-di terc-butil-p-creso), são empregados nos mais diversos produtos por indústrias de alimentos, cosméticos e de fármacos, com finalidade de aumentar a vida útil dos produtos, atuar como conservantes e/ou antioxidantes. No entanto, apesar de serem considerados seguros, alguns estudos relatam que quando consumidos em excesso ou quando combinados com algumas substâncias, podem apresentar riscos à saúde humana.

Sendo assim, há uma constante busca por extrair, separar e utilizar antioxidantes de matrizes naturais, como a curcumina. A curcumina é um composto polifenólico derivado dos rizomas do açafrão-da-terra (ou cúrcuma), de alta potencialidade antioxidante e com comprovados efeitos farmacológicos, anti-inflamatórios e anticarcinogênicos. Além disso, a curcumina apresenta grande potencial para ser utilizada como inibidora da atividade enzimática da  $\alpha$ -amilase, podendo ser aplicada pela indústria farmacêutica e alimentícia com intuito de inibir a hidrólise do amido no corpo humano.

Por ser pouco solúvel em água, alguns solventes orgânicos são utilizados para extração e separação da curcumina, como por exemplo, o etanol, o metanol e a acetona. No entanto, mesmo apresentando grande capacidade de extração, os solventes orgânicos podem ser tóxicos, não biodegradáveis e de alto valor agregado, o que acarreta problemas ambientais e custo elevado do produto final.

Dessa forma, como alternativa a utilização de solventes orgânicos, são estudadas as potencialidades de solubilização de solventes verdes, como os

solventes eutéticos profundos, ou DES, do inglês *Deep Eutectic Solvents*. Os DES foram propostos em 2003 por Abbott e colaboradores como uma nova classe de solventes composta por dois ou mais componentes, sendo que, um desses atua como doador de hidrogênio (HBD – *Hydrogen Bond Donor*) e outro como receptor de hidrogênio (HBA – *Hydrogen Bond Acceptor*). Os sais quaternários de amônio, como o cloreto de colina, o mentol e a betaína, são exemplos de compostos utilizados como HBA. Enquanto como HBD são empregadas as aminas, amidas, açúcares, álcoois e ácidos carboxílicos, por exemplo.

Além de serem considerados de baixo custo e simples preparo, os DES se destacam por possuírem pouca ou nenhuma toxicidade, diminuindo os custos de processo, uma vez que, dependendo da aplicação pretendida, pode dispensar a necessidade de etapas de separação e purificação soluto/solvente.

Os solventes são parâmetros importantes durante os processos de separação, extração e solubilização do composto alvo. Tanto a compreensão das características das moléculas envolvidas, bem como o entendimento das interações entre soluto e solvente, se fazem necessários.

Assim, ressalta-se a importância da obtenção de dados de solubilidade, a predição, com emprego de modelos tipo COSMO (do inglês - *COnductor-like Screening Model*), por exemplo, análises de densidade, viscosidade, entre outras, que auxiliam na eficiência dos processos de separação e purificação dessas biomoléculas.

Além disso, no caso de compostos hidrofóbicos a aplicação de aditivos em meio aquoso pode ser uma alternativa para aumentar a solubilidade desses solutos. Por exemplo, a adição de alguns sais na água, como o cloreto de colina, pode gerar os fenômenos de *salting-in* ou *salting-out* causando alteração na solubilidade. Além dos sais, os açúcares e os DES, são exemplos de compostos que podem ser utilizados como aditivos em meio aquoso com intuito de alterar o comportamento da solubilidade dos compostos.

Contudo, sabe-se que ao misturar compostos de alta polaridade com os DES, caso da água, sua estabilidade é afetada dependendo da concentração, bem como suas características físico-químicas de polaridade, viscosidade e densidade, por exemplo. Em alguns casos, quando DES é adicionado em água, há quebra das ligações de hidrogênio formadoras do DES e haverá uma mistura simples dos

compostos utilizados no seu preparo. No entanto, a melhora na solubilização da biomolécula alvo, pode ser o ponto mais importante.

Algumas biomoléculas, como a curcumina, quercetina, ácido gálico e a cafeína são amplamente estudadas e aplicadas em diversas indústrias, principalmente a de alimentos, devido suas propriedades, como capacidade de atuarem como agentes antioxidantes. A quercetina e a curcumina, moléculas hidrofóbicas, são exemplos de compostos que podem ser solubilizados em soluções aquosas com aditivos, para análise das possíveis alterações e aumento da solubilidade. O ácido gálico, por sua vez, quando acrescentado em meio aquoso e sal, pode gerar efeito hidrótopo. Neste caso, ocorre aumento e redução da solubilidade do ácido gálico dependendo da concentração do sal, sendo este considerado um efeito bastante complexo, contudo, muito interessante do ponto de vista industrial. A cafeína, dentre as três biomoléculas citadas, é a que apresenta a maior afinidade com água, sendo assim, aditivos em água podem gerar uma competição de solubilização entre água e cafeína e água e aditivo, com conseqüente redução da solubilidade.

Para auxiliar no melhor entendimento das interações moleculares são empregados modelos preditivos, como os tipo COSMO. A partir do uso destes modelos, pode-se calcular o coeficiente de atividade dos componentes da solução, avaliação do percentual de cargas polares e apolares das moléculas envolvidas, entre outros parâmetros. Auxiliando na seleção do solvente mais adequado para a molécula de interesse, reduzindo trabalhos laboratoriais, uso de reagentes e tempo de estudo.

Diante do exposto, percebe-se que para uma adequada aplicação industrial, o conhecimento das interações entre soluto e solvente é necessária. Além disso, o conhecimento das possíveis atividades bioativas que estes possam apresentar, é outro parâmetro que deve ser avaliado. As atividades biológicas que esses extratos e/ou solventes podem ter são diversas. Podem ser avaliadas a capacidade de inibição das atividades enzimáticas das colinesterases e as  $\alpha$ -amilases, capacidade antimicrobiana, antioxidante e a capacidade de quelação do íon de  $Fe^{2+}$ . Uma vez determinadas as atividades biológicas dos extratos, é possível propor e desenvolver processos e produtos mais compatíveis com o consumo humano. Nesse contexto, a determinação de citotoxicidade e genotoxicidade dos solventes e extratos obtidos se tornam essenciais.

São inúmeras as combinações possíveis no preparo dos DES, que apresentam diversas vantagens frente aos solventes convencionais. Além disso, estes solventes possuem potencial para atuar como agentes extratores de diversas matrizes naturais. Dessa forma, percebe-se uma constante necessidade de avaliar, pesquisar e explorar processos de extração e separação de compostos bioativos naturais, de alto valor agregado para as indústrias de alimentos, de fármacos e cosméticos. Para isso, se faz necessário a otimização dos processos de extração e separação, estudo de novas técnicas e o emprego de solventes seguros e de baixa toxicidade que minimizem os impactos ambientais causados por esses processos. Além disso, para eficiência dos processos de extração é necessária a determinação dos dados de solubilidade. Já a avaliação das mais diversas atividades biológicas que os extratos obtidos possam apresentar, se justifica para futuras aplicações destes em produtos destinados ao consumo humano.

Diante do exposto, pretende-se que este trabalho contribua para a melhor compreensão quanto o potencial de aplicação dos DES para extração e separação de compostos bioativos, auxiliando no entendimento das interações soluto e solvente.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar o emprego de solventes e processos compatíveis com a natureza, na extração de compostos bioativos presentes na *Curcuma longa* L., rizoma, folha e flor, e dessa forma obter extratos e frações com potencial de desenvolvimento de produtos nas áreas de alimentos, cosméticos e fármacos.

### 1.2.2 Objetivos específicos

Para atingir o objetivo geral, foram estipulados os seguintes objetivos específicos:

- Identificar, por meio da revisão de literatura, os principais compostos bioativos presentes na *Curcuma longa* L.;

- Selecionar solvente, temperatura e tempo no processo de extração dos compostos bioativos presente no rizoma, folha e flor da *Curcuma longa* L.;
- Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos de diferentes partes da *Curcuma longa* L., por meio dos métodos de DPPH, FRAP e flavonoides totais;
- Avaliar capacidade quelante do íon de  $Fe^{2+}$ , atividade antimicrobiana, efeito nas atividades enzimáticas das colinesterases e  $\alpha$ -amilases dos extratos e dos DES selecionados;
- Avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade dos DES e extratos (DES e rizoma, folha ou flor da *Curcuma longa* L.) em células de *Allium cepa* L.;
- Analisar a interação da  $\alpha$ -amilase pancreática suína com o extrato de DES e rizoma da cúrcuma para verificar as alterações da atividade enzimática, empregando as técnicas de Calorimetria de Titulação Isotérmica, Dicroísmo Circular, Fluorescência e *Docking Molecular*;
- Determinar a solubilidade das biomoléculas de interesse do projeto (curcumina, quercetina, ácido gálico e cafeína) em soluções aquosas de DES e seus compostos individuais;
- Empregar modelos tipo COSMO para predição da solubilidade das biomoléculas (curcumina, quercetina, ácido gálico e cafeína) em soluções aquosas de DES e seus constituintes individuais;
- Determinar o coeficiente de atividade, perfil sigma e percentual de polaridade dos compostos envolvidos por meio do emprego de modelos tipo COSMO, para melhor compreensão das interações moleculares.

## CAPÍTULO 2 – REVISÃO DA LITERATURA E ESTADO DA ARTE

---

### 2.1 REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo é descrito o estado da arte, relacionado ao tema de interesse do trabalho, que está apresentado como: Compostos Bioativos; Antioxidantes, *Curcuma longa* L., Composição química da *Curcuma longa* L., Métodos convencionais para a extração dos antioxidantes, Solventes empregados na extração dos antioxidantes, Solventes Verdes, Solventes Eutéticos Profundos (DES) e Aplicação dos DES para extração de biomoléculas.

### 2.2 COMPOSTOS BIOATIVOS

Cada vez mais há um aumento expressivo em pesquisas referente ao estudo de compostos bioativos em alimentos. Este fato se deve principalmente ao reconhecimento da relação entre dieta e saúde. Evidências mostram que informações de uma nutrição personalizada podem acarretar uma melhora direta nos efeitos biológicos do corpo humano, proporcionando uma vida mais longa e saudável (DUARTE; REIS, 2019).

O consumo regular de frutas, hortaliças, cereais, grãos e legumes está atribuído aos benefícios à saúde, por apresentarem os nutrientes essenciais ao corpo humano. Além disso, são fontes de compostos bioativos (CBA), que por definição, são metabólitos sintetizados por plantas, encontrados na natureza com ampla variação na estrutura química (SEPTEMBRE-MALATERRE; REMIZE; POUCHERET, 2018). Os CBAs podem ser divididos em três principais classes presentes na dieta humana habitual, sendo estas: os polifenóis, carotenoides e os glicosinolatos (HORST; CRUZ; LAJOLO, 2016).

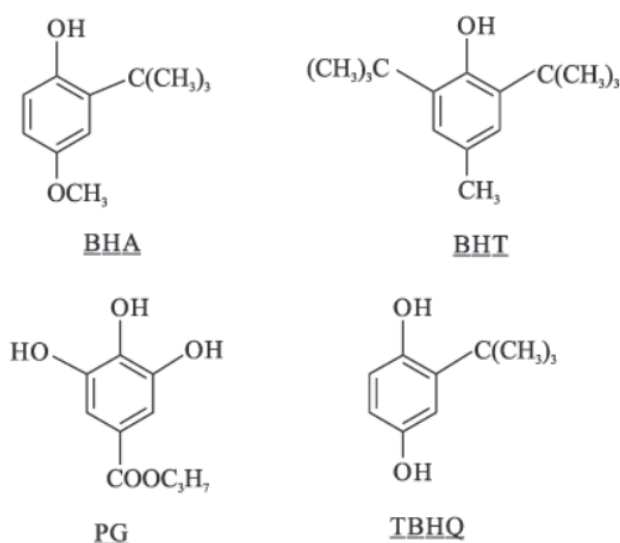
Diversas pesquisas evidenciam que a ingestão frequente dos CBAs, por possuírem alta capacidade antioxidante, associam-se com um menor risco de doenças crônicas não transmissíveis (STEINBRECHER; IMPTSCH; HÜSING, 2009; TRESSERRA-RIMBAU; GUASCH-FERRÉ; SALAS-SALVADÓ, 2016), como as doenças cardiovasculares, câncer, Alzheimer (PURI; SHARMA; BARROW, 2012), entre outras, além da redução na taxa precoce da mortalidade (AUNE; KEUM;

GIOVANNUCCI, 2018). Por estas razões, o emprego de CBAs nas indústrias de alimentos e fármacos é cada vez mais comum.

### 2.3 ANTIOXIDANTES

A indústria de alimentos utiliza antioxidantes para melhorar a estabilidade dos seus produtos, evitando e reduzindo a oxidação lipídica, e também aumentando o valor comercial dos mesmos. Segundo Ramalho e Jorge (2006) os compostos fenólicos BHA (2,3-terc-butil-4-hidroxianisol), BHT (2,6-di terc-butil-p-cresol), tercbutilhidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG) são antioxidantes sintéticos e os mais utilizados para tais finalidades, na FIGURA 1 encontram-se as estruturas químicas destes compostos.

FIGURA 1 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DO BHA, BHT, PG E TBHQ



FONTE: Ramalho e Jorge (2006).

Tanto o BHA como o BHT são amplamente utilizados pela indústria alimentícia e essa larga aplicação se deve ao fato de serem considerados seguros pelo governo norte americano, sendo classificados como *GRAS*, (do inglês – *Generally Recognized As Safe*), por possuírem baixa ou nenhuma ação carcinogênica nos testes aplicados (RODRIGUES et al., 2013).

No entanto, alguns estudos relatam efeitos adversos à saúde devido a ampla utilização desses antioxidantes sintéticos nos alimentos (DEVATKAL; NARSAIAH; BORAH, 2010). Estes fatos fomentam cada vez mais a busca por antioxidantes

naturais que podem ser extraídos de plantas, raízes e parte das plantas, sendo mais aceitos pelos consumidores do que os antioxidantes sintéticos, possuindo também a capacidade de aumentar a vida útil dos alimentos.

Diversos alimentos estão sendo explorados como potenciais fontes naturais de antioxidantes por múltiplos autores. Dessa forma, uma gama de estudos se concentra na investigação da atividade antioxidante de diferentes fontes naturais, tais como, sementes e suco de romã (DERAKHSHAN et al., 2018), amêndoas (DAMMAK et al., 2018), limão (AL-QASSABI et al., 2018), curcumina (ALISI et al., 2018), ácido gálico (BADHANI; SHARMA; KAKKAR, 2015), quercetina (XU et al., 2019), entre outros.

#### 2.4 *CURCUMA LONGA L.*

A cúrcuma (*Curcuma longa L.*), também denominada de açafrão-da-terra, é uma planta medicinal pertencente à família Zingiberaceae, a mesma do gengibre e do cardamomo. Ela faz parte de centenas de plantas que possuem raízes ou rizomas subterrâneos como hastes que pertencem ao gênero *Curcuma*, como pode ser observado na FIGURA 2 (JAYAPRAKASHA; JAGANMOHAN RAO; SAKARIAH, 2005; GUPTA; KISMALI; AGGARWAL, 2013).

Originária do sul da Índia, é uma planta muito cultivada na China, Kuwait, Indonésia e Sri Lanka. É de cultivo simples não exigindo tratamentos culturais especiais, desenvolve-se bem em diversas condições tropicais, em temperaturas de 20 até 30 °C e em altitudes variadas. Seu alastramento se dá pela divisão das raízes ou rizomas e sua colheita é realizada quando as folhas estão amareladas, sendo estes retirados da terra, lavados e secos para serem processados (GOVINDARAJAN, 1980).

No Brasil, os estados de Goiás, Mato Grosso, São Paulo e Minas Gerais apresentam a maior concentração de cultivos. Mara Rosa (GO) é o município responsável por 95% da produção nacional, chegando a uma produtividade anual de aproximadamente 15 mil toneladas. A produção no Brasil se dá na entressafra da Índia, o que facilita a negociação da cúrcuma entre os países e melhora do preço. Em 2001, Mara Rosa exportou cerca de 30 toneladas de cúrcuma em pó para Índia e, devido as oportunidades de mercado a busca pelo processamento da cúrcuma e geração de produtos com um maior valor agregado estão cada vez mais em alta, como é o exemplo da curcumina, a oleorresina e o amido de cúrcuma (BERNI et al., 2014).

FIGURA 2 – IMAGEM ILUSTRATIVA DA PLANTA *CURCUMA LONGA* L.

FONTE: Schneider (2021).

Os rizomas são muito utilizados como corantes e condimentos devido sua coloração amarela e aroma característico, além de ser amplamente aplicado por suas propriedades medicinais, uso em cosméticos e práticas religiosas citados em textos antigos (CHATTOPADHYAY et al., 2004).

#### 2.4.1 Composição química da *Curcuma longa* L.

Os rizomas da *Curcuma* são constituídos por proteínas, lipídeos, carboidratos, minerais e umidade, em que a composição pode se diferenciar em relação as características da região de produção, prática de cultivo, uso de fertilizantes e maturidade dos rizomas. A *Curcuma* oriunda da Índia constitui-se aproximadamente de 69,4% de carboidratos, 13,1% de umidade, 6,3% de proteínas, 5,1% de lipídeos e 3,5% de minerais (CHATTOPADHYAY, 2004).

Dentre estes constituintes majoritários, estão presentes ainda, os óleos essenciais e os pigmentos curcuminóides responsáveis pela coloração amarela

característica da *Curcuma* (PERKO et al., 2015). Na TABELA 1 encontram-se a composição centesimal obtida por alguns pesquisadores ao avaliar a *Curcuma* seca e *in natura*. Os produtos de degradação do amido formados durante a secagem não foram analisados.

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO RIZOMA DE *CURCUMA* SECO E *IN NATURA* CULTIVADOS EM MINAS GERAIS (MG) E EM SÃO PAULO (SP).

Base Úmida (%)	<sup>(a)</sup> <i>Curcuma</i> Seca (MG)	<sup>(a)</sup> <i>Curcuma</i> Seca (SP)	<sup>(b)</sup> <i>Curcuma in natura</i> (MG)
Cinzas	8,5	5,9	6,4
Fibras	3,0	1,6	5,5
Lipídeos	5,1	3,4	7,2
Amido	19,0	34,0	35,3
Proteína	10,7	12,2	11,6
Açúcar Redutor	7,0	3,2	1,2
Umidade	8,0	9,3	74,7
Oleoresina (fração volátil)	7,3	7,3	3,1
Oleoresina (fração fixa)	1,4	1,4	4,4
Não analisado	30,0	15,0	69,6

FONTE: <sup>(a)</sup>Braga, Leal e Meireles 2003 e <sup>(b)</sup>Cecílio Filho et al., 2000.

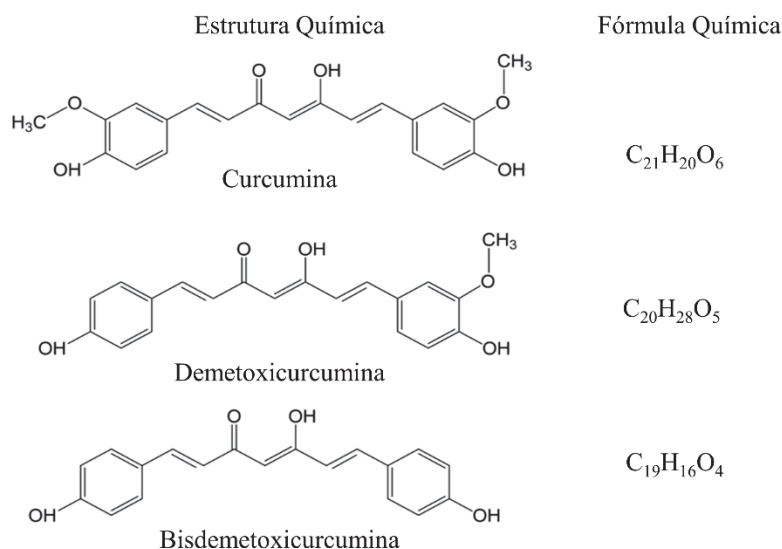
Na fração volátil de oleoresina está presente o óleo essencial formado por vários compostos responsáveis pelo aroma. O aroma característico da *Curcuma* é devido a presença de cetonas sesquiterpênicas formadas por aproximadamente 59% de ar-turmerona, dehidroturmerona e turmerona (SINGH et al., 2010).

Já na fração fixa da oleoresina encontram-se os curcuminóides que são constituídos principalmente de misturas de pigmentos de curcumina, demetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina em concentrações aproximadas de 77%, 17% e 3%, respectivamente (GUPTA; KISMALI; AGGARWAL, 2013; ALMEIDA et al., 2018), na FIGURA 3 são apresentadas as estruturas químicas desses pigmentos.

A curcumina se destaca como sendo a mais importante fração da cúrcuma, uma vez que, é muito utilizada para a prevenção e tratamento de várias doenças, como o câncer, diabetes, alergias e outras doenças crônicas, devido ao seu potencial antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano e atividades antiparasitárias (ASAI; NAKAGAWA E MIYAZAWA, 1999), utilizada em cosméticos como cremes faciais (MIQUEL et al., 2002), já na indústria alimentícia é aplicada como suplemento

nutricional dos alimentos, comercializada como cápsulas e xaropes, e pelo seu alto poder de coloração é empregada como corantes em queijos, manteigas e outros produtos (JAYAPRAKASHA; RAO; SAKARIAH, 2005; LEE; CHOUNG, 2011).

FIGURA 3 – ESTRUTURA E FÓRMULA QUÍMICA DOS PIGMENTOS DA *CURCUMA*: BISDEMTOXICURCUMINA, DEMTOXICURCUMINA E CURCUMINA



FONTE: Koop (2012).

Dessa forma, diversas pesquisas concentram seus objetivos em determinar as condições ótimas de extração dos compostos antioxidantes de matrizes naturais, determinando os melhores parâmetros, mecanismos e técnicas de extração, tempo, temperatura, solvente, sendo estes fundamentais e muito importantes para acarretar uma extração eficiente (BONILLA et al., 2015).

## 2.5 MÉTODOS CONVENCIONAIS PARA EXTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTES

Os métodos de extração e escolha do solvente são determinantes para maximizar a eficiência de separação do composto de interesse.

A eficiência da extração pode ser influenciada por diversos fatores, tais como: tipo de solvente, razão entre sólido/solvente, tempo, temperatura, pH, entre outros. A extração é a primeira etapa para o isolamento e a purificação de compostos, sendo que várias técnicas podem ser aplicadas para esse fim, como, por exemplo, a técnica Soxhlet (SANTOS, 2013a), a extração por fluídos supercríticos (GELMEZ; KINCAL;

YENER, 2009), assistida por micro-ondas (CUJIC et al., 2016; MAZZUTTI, 2016) e, umas das mais utilizadas a extração assistida por ultrassom.

No QUADRO 1 são apresentadas as principais aplicações, algumas vantagens e limitações das técnicas de extração Soxhlet, supercrítica, micro-ondas e ultrassom, citadas anteriormente.

QUADRO 1 - VANTAGENS E LIMITAÇÕES DAS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO SOXHLET, SUPERCRÍTICA, ULTRASSOM E MICRO-ONDAS

<b>TÉCNICA DE EXTRAÇÃO</b>	<b>VANTAGENS</b>	<b>LIMITAÇÕES</b>	<b>APLICAÇÕES PRINCIPAIS</b>
<sup>(A)</sup> Soxhlet	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extração eficiente;</li> <li>- Solutos/solvente quase sempre em contato;</li> <li>- Processo simples;</li> <li>- Sem necessidade de filtração após extração.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Uso excessivo de solvente;</li> <li>- Utilização de solventes orgânicos;</li> <li>- Altas temperaturas;</li> <li>- Tempo longo de extração.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extração de lipídeos;</li> <li>- Alimentos, farmacêutica e cosméticos.</li> </ul>
<sup>(B)</sup> Supercrítica	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rápida;</li> <li>- Baixo consumo de solventes;</li> <li>- Extrato concentrado;</li> <li>- Método seletivo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Muitos parâmetros para otimização;</li> <li>- Complexo uso;</li> <li>- Alto consumo energético.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Compostos bioativos;</li> <li>- Alimentos, farmacêutica e cosméticos.</li> </ul>
<sup>(A)</sup> Ultrassom	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Redução do tempo e temperatura de processo;</li> <li>- Aumento da transferência de calor;</li> <li>- Operação por batelada ou contínua;</li> <li>- Efeito na atividade enzimática;</li> <li>- Baixo consumo de solventes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Possível dano por radicais livres.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Compostos bioativos;</li> <li>- Alimentos, farmacêutica e cosméticos.</li> </ul>
<sup>(B)</sup> Micro-ondas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rápida;</li> <li>- Moderado consumo de amostra e solvente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- O solvente é o principal responsável pela absorção da irradiação.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Compostos bioativos;</li> <li>- Alimentos, farmacêutica e cosméticos.</li> </ul>

FONTE: <sup>(A)</sup>FELLOWS, 2009; <sup>(B)</sup>CHEMAT et al., 2011.

A técnica de extração assistida por ultrassom utiliza ondas mecânicas com frequências maiores que 20 KHz (CASTRO et al., 2011; CHEMAT et al., 2011), que pode se propagar em meios sólidos, líquidos e gasosos. A cavitação é um dos fenômenos produzidos quando o ultrassom se propaga nos líquidos e ocasiona a formação de cavidades, que através da migração dos gases dissolvidos geram microbolhas, que diminuem e aumentam de tamanho, e estes ciclos de expansão e

compressão ocorrem até que as bolhas implodem e liberam calor, exercendo elevadas pressões próximas a região de implosão (VEILLET et al., 2010; CARCEL et al., 2012).

As colisões geradas pelas microbolhas provocam o rompimento das células vegetais e facilitam a difusão do solvente extrator para o interior da matriz, aumentando a eficiência de extração. Concomitantemente, com o calor liberado durante as implosões existe um aumento da solubilidade. Assim, ao mesmo tempo ocorre a agitação e a extração dos compostos presentes na mistura, o que reduz consideravelmente o tempo de extração quando comparado aos métodos tradicionais de extração (VILKHU et al., 2008; VEILLET et al., 2010; CHEMAT et al., 2011).

O método de extração assistida por ultrassom pode ser realizado em diversos equipamentos, sendo um dos mais comumente utilizado o banho de ultrassom (JERMAN et al., 2010). O banho de ultrassom se caracteriza como sendo um dispositivo relativamente simples. A eficiência do processo depende da intensidade e da distribuição da energia ultrassônica que será disposta no sistema. O tamanho e a posição que a amostra é colocada no interior do recipiente também interferem na qualidade da extração (CHEMAT et al., 2011).

Outros parâmetros devem ser avaliados quando se utiliza o ultrassom, como, por exemplo, a temperatura de extração e a frequência das ondas empregadas. Geralmente, os banhos apresentam uma faixa de intervalo de trabalho que varia de 20 a 40 KHz (CASTRO et al., 2011). A intensidade da sonicação, a presença de gases, o tamanho das partículas, a pressão interna aplicada, a viscosidade, a tensão superficial e a pressão de vapor do solvente são alguns fatores que influenciam na cavitação (CÁRCEL et al., 2012).

Os solventes polares absorvem mais as micro-ondas do que os apolares e essa absorção depende das suas propriedades dielétricas. Sendo assim, os solventes apolares possuem uma aplicação maior nesse tipo de extração (MAZZUTTI, 2016).

Em todas as técnicas apresentadas anteriormente, percebe-se o emprego de solventes para que o processo seja completo e realizado de forma adequada e, como já mencionado, a escolha do método de extração e do solvente são dois dos pontos mais importantes para uma separação ideal. Dessa forma, o estudo quanto à afinidade extrato-solvente, afinidade química, polaridade, e solubilidade de cada solvente adquire extrema relevância nesse processo (OLIVEIRA, 2010).

## 2.6 SOLVENTES EMPREGADOS NA EXTRAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES

A seleção do solvente correto nem sempre é uma tarefa simples, uma vez que muitos fatores precisam ser considerados. O composto de interesse, soluto, deve ser solúvel no solvente e após o processo de extração, deve ser separado do solvente sem que esse processo degrade ou cause dano à matriz de interesse (MULLIN, 1993).

Para a extração de compostos antioxidantes oriundos de matrizes vegetais, como plantas e raízes, nas técnicas mais empregadas há necessidade da utilização de solventes orgânicos, devido à sua alta aplicabilidade, eficiência e facilidade de uso, sendo o metanol, etanol, acetona e acetato de etila os mais usados para este fim (MUHAMMAD et al., 2017).

De forma a atender as características de cada biomolécula, diminuir custos de produção, reduzir a utilização de solventes orgânicos tóxicos, além de minimizar os impactos ambientais, percebe-se uma demanda crescente de pesquisas acadêmicas e industriais com interesse pela síntese e utilização de solventes atóxicos denominados de *green solvents* ou solventes verdes (NULWALA; MIRJAFARI; ZHOU, 2018).

Atualmente, a tecnologia verde é uma das principais questões na área ambiental e temas afins, por visar preservar o meio ambiente e reduzir a influência negativa do envolvimento humano. A utilização de solventes atóxicos, como a água, e o desenvolvimento de novos solventes verdes, pertencem aos assuntos mais importantes dentro desta tecnologia, sendo os líquidos iônicos, bem como os solventes eutéticos profundos os tipos mais promissores (ZDANOWICZ; WILPISZEWSKA; SPYCHAJ, 2018).

### 2.6.1 Solventes Verdes

- **Água como solvente**

A água é utilizada para dissolver sólidos, líquidos e gases, e devido à alta capacidade de solubilizar um grande número de substâncias é popularmente conhecida como “solvente universal”. Seu caráter polar a torna um ótimo solvente para compostos polares e iônicos, quando as moléculas possuem grupos funcionais,

como hidroxilas, carbonilas, carboxilas e aminas, a solubilidade em água é maior por formarem ligações de hidrogênio (MULLIN, 1993).

A água é considerada um bom solvente devido às grandes forças intermoleculares que se estabelecem com as ligações de hidrogênio, e pela sua elevada constante dielétrica (FIGUEIREDO, 2004). Pode ser utilizada para a solubilização de solutos orgânicos e inorgânicos, pois possui a capacidade de estabilizar íons em solução, mantendo-os separados. É um solvente de fácil acessibilidade, atóxico e de baixo custo.

Devido a sua alta capacidade em dissolver diversos compostos, a aplicação da água como solvente é restrita, uma vez que, além do composto de interesse seriam dissolvidos a maioria dos compostos presentes no sistema, impedindo a separação (MULLIN, 1993; FIGUEIREDO, 2004). Dessa forma, percebe-se o crescente número de publicações nos últimos anos de estudos relacionados com a compreensão e desenvolvimento de solventes específicos que possuam alta afinidade com a matriz de interesse.

- **Líquidos Iônicos**

Os líquidos iônicos, ILs do inglês *Ionic Liquids*, é uma classe de sais compostos por cátions e ânions com pontos de fusão abaixo de 100 °C, possuem características físico-químicas relevantes para o setor de extração e separação, como estabilidade térmica e química, alto potencial eletroquímico, excelente capacidade de solubilizar substâncias orgânicas, inorgânicas e organometálicas. Estas propriedades, proporcionam elevado potencial em diversas aplicações no campo industrial e laboratorial (NULWALA; MIRJAFARI; ZHOU, 2018).

Na última década, o estudo sobre os líquidos iônicos contribuiu com um grande número de publicações, sendo que até o ano de 2017 esse número ultrapassou 7 mil artigos científicos, os quais podem ser encontrados nas mais diversas bases de busca. Os primeiros esforços quanto ao tema, foram focados no desenvolvimento de líquidos iônicos como solventes verdes, devido à sua não volatilidade. Contudo, recentes descobertas ampliaram este campo de estudo, uma vez que, apresentam um conjunto ilimitado de propriedades ajustáveis. Ou seja, as propriedades físico-químicas dos líquidos iônicos podem ser personalizadas com base nas estruturas de seus íons, o designando para uma tarefa específica, que talvez seja a principal razão

para sua vasta popularidade em diversas áreas científicas (MACFARLANE et al., 2014; MIRJAFARI, 2018).

Entretanto, devido a razões econômicas (síntese, purificações demoradas e elevado custo de produção), toxicidade e baixa biodegradabilidade de alguns reagentes utilizados na sua obtenção, a utilização e aplicação dos líquidos iônicos por muitas vezes se torna restrita (WEI et al., 2015; KUDŁAK; OWCZAREK; NAMIEŚNIK, 2015). Dessa forma, considerando as limitações dos líquidos iônicos, foi proposto um novo conjunto de solventes denominado de Solventes Eutéticos Profundos.

## 2.7 SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS (DES)

Em 2003 Abbott e colaboradores introduziram uma nova classe de solventes, a qual denominaram de solventes eutéticos profundos ou DES, do inglês *Deep Eutectic Solvents*. Os DES são obtidos a partir de dois ou mais compostos, sendo que, um desses sempre atua como doador de hidrogênio (HBD – *Hydrogen Bond Donor*) e outro como receptor de hidrogênio (HBA – *Hydrogen Bond Acceptor*).

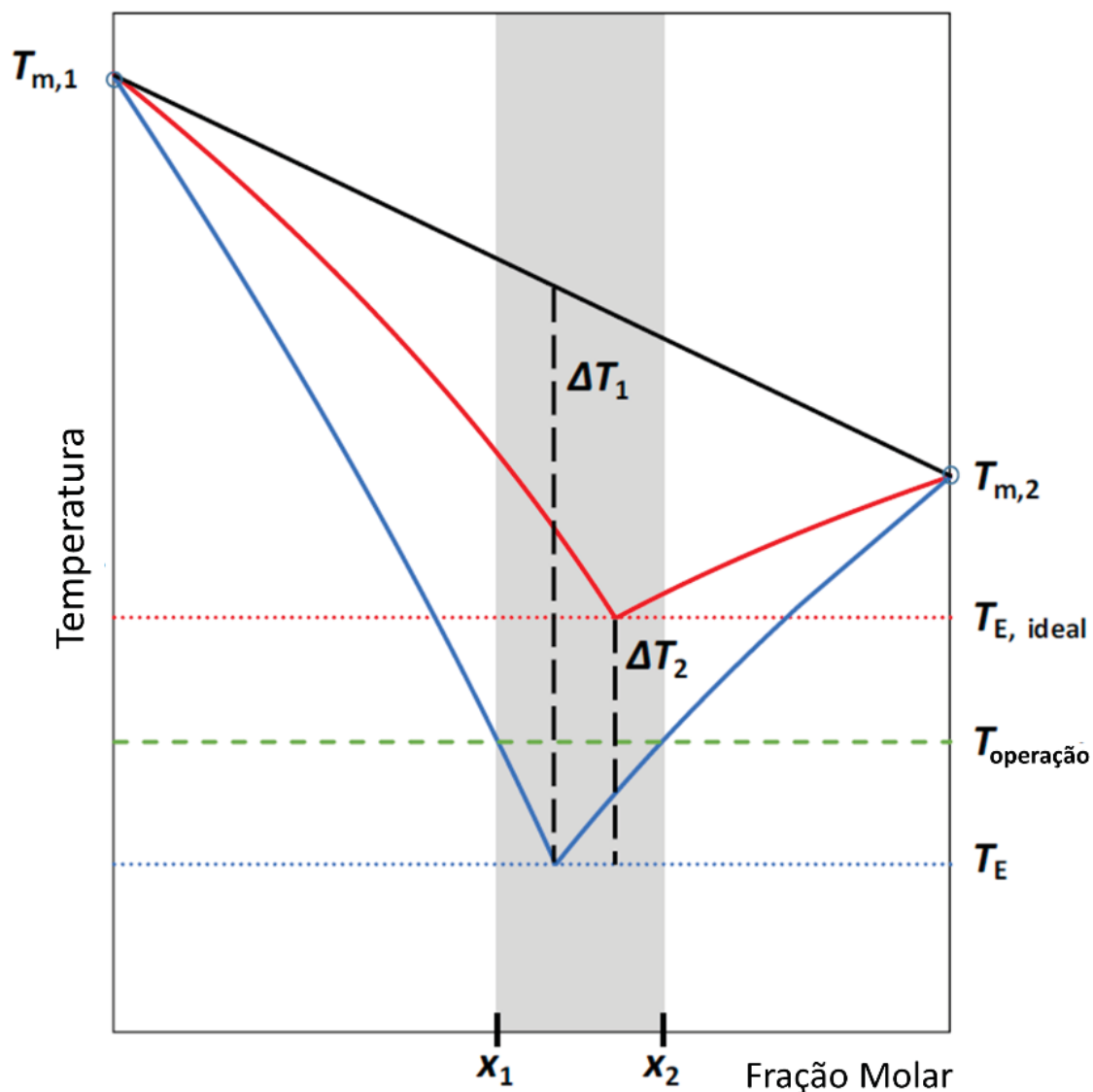
Os sais quaternários de amônio são geralmente utilizados como HBA, enquanto que as aminas, amidas, álcoois e ácidos carboxílicos, ou qualquer composto que possa atuar como doador de hidrogênio, como HBD. As fortes ligações de hidrogênio formadas entre esses compostos provocam um abaixamento na temperatura de fusão ( $T_f$ ), ou seja, a temperatura de fusão do DES é bem menor do que a temperatura de fusão dos seus constituintes puros, formando assim uma mistura eutética, geralmente líquida em temperatura ambiente (LIU et al., 2008; DAI, 2013a; WANG et al., 2015).

Na FIGURA 4 é mostrado um exemplo de um diagrama de fases, equilíbrio sólido-líquido (ELS), para uma solução ideal e de um DES.

O primeiro DES a ser sintetizado por Abbott et al. (2003) foi a mistura de cloreto de colina e ureia, na razão molar de 1:2, em que o cloreto de colina atuou como HBA e a ureia como HBD, ambos com alta temperatura de fusão. Os autores observaram a  $T_f$  da mistura em torno de 12 °C. Ao estudarem essa mistura, perceberam alta capacidade em atuar como solvente, notaram a formação de ponto eutético e que possuíam  $T_f$  bem inferiores quando comparadas às dos seus componentes individuais (aproximadamente 302 °C para o cloreto de colina e 133 °C para a ureia), dessa forma, os denominaram Solventes Eutéticos Profundos. Na FIGURA 5, pode-se observar um

exemplo de formação de DES, a partir de um HBA (cloreto de colina) e um HBD (etileno glicol), que ocorrem por meio de ligação de hidrogênio.

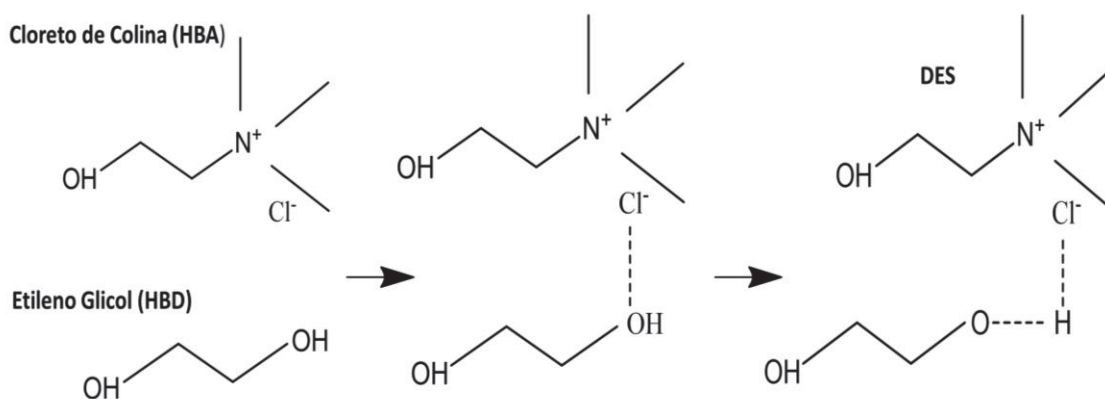
FIGURA 4 – DIAGRAMA DE FASES EQUILÍBRIO SÓLIDO-LÍQUIDO (ESL) DE UMA SOLUÇÃO IDEAL E DE UM DES



FONTE: Martins, Pinho e Coutinho (2018).

Quando dois ou mais compostos (HBA + HBD) são utilizados para o preparo do DES, ocorre uma redução na temperatura de fusão quando comparada as temperaturas de fusão dos reagentes puros, denominada temperatura eutética. Contudo, para caracterizar um DES, a temperatura eutética ( $T_E$ ) é menor que a temperatura eutética para a solução ideal ( $T_{Eideal}$ ), conforme observado na FIGURA 4, curvas azul e vermelha, respectivamente.

FIGURA 5 – EXEMPLO DA FORMAÇÃO DE UM SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO (CLORETO DE COLINA + ETILENO GLICOL)



FONTE: Chandran et al. (2019).

#### • Preparo dos DES

Na literatura são descritos e explorados principalmente dois métodos para o preparo dos DES, sendo estes conhecidos como método de aquecimento e método de evaporação.

Segundo Dai (2013a) o método de aquecimento consiste basicamente em manter a mistura (HBA + HBD) aquecida e em constante agitação. Inicialmente, os compostos são pesados de acordo com a massa molar desejada, e então adicionados em banho-maria a uma temperatura de 50 a 60 °C e sob agitação a 300 rpm. Quando se percebe a formação de um líquido homogêneo e transparente as amostras podem ser retiradas do banho, sendo este o indicativo visual da formação do DES.

Ainda segundo o autor, no método de evaporação os constituintes do DES são diluídos em água, adicionados em banho-maria a uma temperatura de 50 a 60 °C sob agitação. Novamente, quando se nota a formação de um líquido homogêneo e transparente as amostras são retiradas, e neste caso, submetidas a um rota-evaporador a 50 °C, para evaporação da água.

O método de aquecimento é o mais utilizado para a síntese dos DES, e, apesar de ser considerado satisfatório para a mesma finalidade, o método de evaporação é menos aplicado, uma vez que, mesmo após evaporada, pode ser que permaneça uma alta concentração de água afetando as características físico-químicas dos DES (Dai, 2013a).

- **Propriedades Físico-Químicas dos DES**

Embora atualmente seja encontrado na literatura diversos estudos referentes aos DES, existem algumas lacunas quanto investigações aprofundadas sobre suas propriedades físico-químicas. São inúmeras as possibilidades para o *design* (síntese e formação) dos DES, uma vez que, cada substituição de um determinado componente, assim como alteração na proporção, resulta em um líquido com características específicas e bastante diversas. Contudo, o conhecimento das principais propriedades físico-químicas envolvendo os DES é muito importante no que diz respeito a caracterização e aplicação desses solventes. A seguir, encontra-se um resumo das principais propriedades a serem investigadas, sendo estas, viscosidade, densidade, pH, condutividade, polaridade, estabilidade e perfil térmico.

A viscosidade dos DES é considerada alta em temperaturas próximas a ambiente, aproximadamente 25 °C, sendo geralmente > 100 cP. Este é um fator relevante para processos industriais, pois dificulta o bombeamento, transferência de massa e a agitação. Esta característica é atribuída, normalmente, as fortes ligações de hidrogênio entre o HBA e o HBD, forças de van der Waals e interações eletrostáticas (ZHANG et al., 2012; DAI et al., 2013; DAI, 2013a).

Com o intuito de diminuir a viscosidade dos DES, algumas pesquisas demonstraram que através da adição de pequenos percentuais de água, tal propriedade pode ser alterada, mesmo para os casos em que os DES não se apresentem líquidos em temperatura ambiente (ABBOTT et al., 2003; ABBOTT et al., 2004; IMPERATO et al., 2006).

Segundo Dai et al. (2013) a adição de água, cerca de 5 a 10% em base mássica, resulta em um DES líquido para a mesma temperatura. Ainda segundo os autores, a proporção de água não pode ser superior a 20%, uma vez que, as ligações de hidrogênio formadoras dos DES são enfraquecidas ou quebradas pela água, e percentuais maiores podem levar a quebra completa da estrutura química do DES, resultando em uma mistura com propriedades distinta das dos DES.

A viscosidade e a densidade são parâmetros influenciados pelos componentes formadores dos DES, pela temperatura e pela adição de água, a densidade normalmente varia de 1,041 g/cm<sup>-3</sup> até 1,63 g/cm<sup>-3</sup> (DAI et al., 2013; HAYYAN et al., 2013). Além das propriedades citadas, a miscibilidade e a polaridade, são

características que influenciam diretamente na extração, uma das principais aplicações dos DES (CUNHA; FERNANDES, 2018).

Como são infinitas as combinações de HBA e HBD que podem ser utilizadas para formulação dos DES, a polaridade é um parâmetro bem amplo que assume diferentes valores. As diversas polaridades dos DES, permitem que estes solventes atuem nas mais variadas extrações, tendo a possibilidade de dissolver metabólitos hidrossolúveis, hidrofóbicos e macromoléculas com características distintas (DAI et al., 2013).

De acordo com o estudo do perfil térmico dos DES podem ser estabelecidos o ponto de fusão, uma das principais propriedades que caracterizam esses solventes, e a presença ou não de transição vítrea, normalmente encontrada abaixo de  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  indicando que alguns DES podem ser considerados como complexos supramoleculares (DAI, 2013a).

As propriedades acima citadas, são influenciadas principalmente pelas interações moleculares entre as unidades formadoras dos DES. Através da combinação das técnicas espectrofotométricas de Ressonância Magnética Nuclear (NMR, do inglês *Nuclear Magnetic Resonance*), Infravermelho Próximo (NIR, do inglês *Near Infrared*) e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR, do inglês *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*), são avaliados a estrutura química da combinação entre os compostos formadores do DES, bem como a estabilidade desses solventes com o passar do tempo.

Essas técnicas foram aplicadas em diversos estudos para determinar a estabilidade térmica dos DES (DELGADO-MELLADO et al., 2018), a estrutura cristalina formada pelas ligações de hidrogênio entre HBA e HBD (YUAN et al., 2018), avaliar a estequiometria, e os átomos envolvidos nessas ligações (ABBOTT et al., 2014; DAI et al., 2013), distribuição isomérica de frutose, glicose e xilose em DES básico, neutro e ácido (WU et al., 2018), entre outros.

## 2.8 APLICAÇÃO DOS DES PARA EXTRAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

Desde 2003, quando os DES foram desenvolvidos, é crescente o número de pesquisas que caracterizam e avaliam o potencial desses solventes, de separar e extrair diversas biomoléculas. De acordo com Cunha e Fernandes (2018) são encontrados um total de 1303 referências sobre os DES, dos quais 321 estão

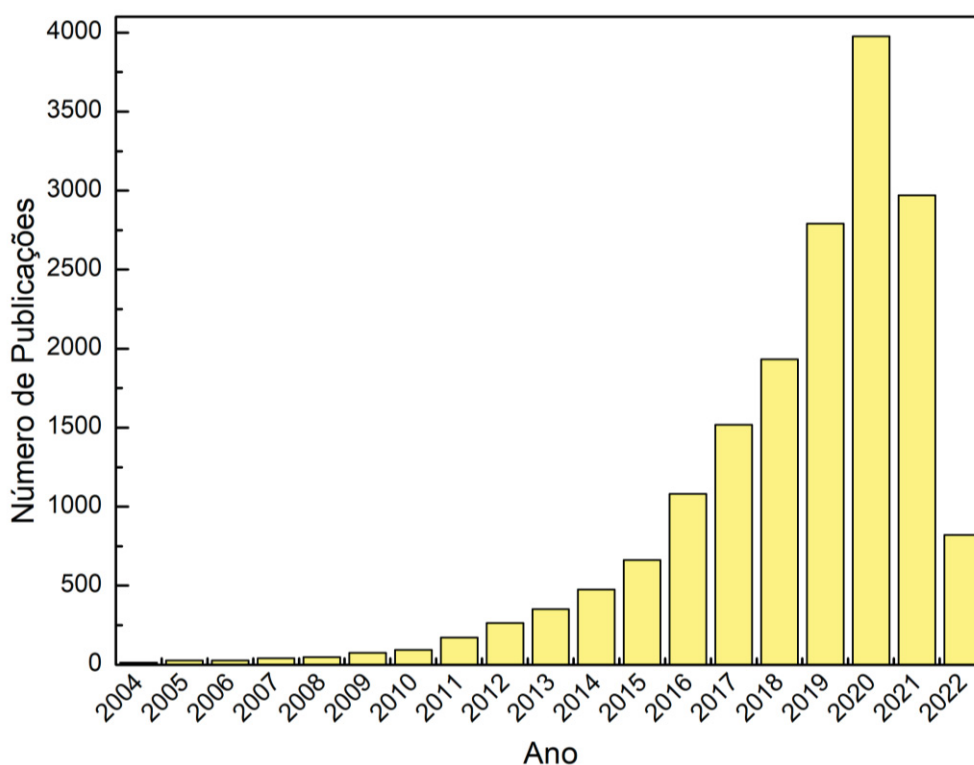
relacionados com procedimentos de extração. Desde 2011, o número de publicações aumentou consideravelmente, e estas pesquisas estão relacionadas e focadas principalmente, no emprego dos DES como solventes para extração, empregados em análise de alimentos, amostras biológicas e ambientais.

Na FIGURA 6, estão exibidos o número de publicações sobre os DES realizadas nos anos de 2004 até 2022. Pode ser observado que desde a sua introdução até o presente momento há uma crescente no número de publicações e um interesse cada vez maior na aplicação desses solventes.

Abaixo são apresentados alguns estudos recentes que utilizaram os DES para extração e solubilidade de biomoléculas, além de, um estado da arte quanto a utilização desses solventes para extração da curcumina e avaliação das bioatividades dos DES e extratos.

Os DES foram empregados como solventes para extração de diversos compostos, tais como: proteínas (WANG et al., 2016; JIANG et al., 2018), polissacarídeos (ZHANG; WANG, 2017; SANTOS et al., 2018; SARAVANA et al., 2018), pigmentos (ZHANGA et al., 2018, ZHU et al., 2018), antioxidantes (AYDIN; YILMAZ; SOYLAK, 2018; CAO et al., 2018; OZTURK et al., 2018), entre outros.

FIGURA 6 – PUBLICAÇÕES RELACIONADAS AOS DES DE 2004 ATÉ 2022



FONTE: Scopus (2022).

Com relação ao emprego de DES na extração e solubilização da curcumina, o estudo de Aydin, Yilmaz e Soylak (2018) avaliou a capacidade do DES em solubilizar curcumina obtida de diferentes fontes (rizomas de *Curcuma Longa* L., cápsulas com alta concentração de curcumina e em chás de açafraão-da-terra) em DES, formado a partir de cloreto de colina e fenol nas proporções molares de 1:2, 1:3 e 1:4. As recuperações médias por meio do DES estiveram entre 96% e 102%, mostrando que o DES utilizado pelos autores possui alta capacidade em solubilizar a curcumina. A proporção de 1:4 do DES e o pH 4 foram consideradas as melhores condições de extração.

Estudos recentes buscam determinar as melhores condições de extração de compostos bioativos presentes em rizomas de cúrcuma, a partir do emprego de DES hidrofílicos (XIE et al., 2020; ALTUNAY; ELIK; GÜRKA, 2020; PATIL; PATHAK; RATHOD, 2021). No entanto, não foram encontrados na literatura atual estudos avaliando a extração dos compostos bioativos presentes nas outras partes da planta, como folha e flor.

A FIGURA 6 confirma o grande interesse e aumento de pesquisas ligadas aos DES desde a sua introdução em 2003 (ABBOTT et al., 2003; SHISHOV et al., 2020). Com relação a avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade dos DES são encontradas algumas pesquisas na literatura (RADOSEVIC et al., 2016; SHAWKY et al., 2018; AHMADI et al., 2018; MACÁRIO et al., 2019; SHEKAARI et al., 2019), principalmente utilizando o cloreto de colina como HBA. Essas análises foram aplicadas também para DES à base de mentol como HBA e ácidos graxos como HBD (PEREIRA et al., 2019; SILVA et al. 2019).

Diante do exposto, percebe-se algumas lacunas a serem preenchidas no que diz respeito ao emprego dos DES na extração de compostos bioativos presentes na *Curcuma longa* L. Como por exemplo, testar diferentes formulações para síntese e emprego de DES hidrofílicos e hidrofóbicos, avaliando o potencial desses solventes em extrair compostos antioxidantes da cúrcuma. Nota-se também, a necessidade de estudos mais aprofundados quanto a interação soluto/DES, na presença e ausência de água, testando e avaliando o comportamento desses solventes em meio aquosos para solubilização de diferentes biomoléculas. Estas hipóteses foram avaliadas neste estudo.

## CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS

---

Este trabalho foi realizado na Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba – PR, sendo a maior parte desenvolvida no Laboratório de Termodinâmica e Operações de Separação (LATOS) do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos (PPGEAL). As análises biológicas da atividade enzimática da acetil e butirilcolinesterase,  $\alpha$ -amilase salivar humana e pancreática suína, citotoxicidade e genotoxicidade em células de *Allium cepa* L., foram realizadas em parceria com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campo Mourão – PR, nos laboratórios do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA).

### 3.1 PREPARO DAS AMOSTRAS DE RIZOMA, FOLHA E FLOR DA *CURCUMA LONGA* L.

As amostras (rizomas, folhas e flores da *Curcuma longa* L. mostrados na FIGURA 7) foram coletados de exemplares cultivados em Piraquara, Paraná, Brasil (S 25° 503' 261" e W 49° 003' 917"). As partes da planta foram higienizadas com água deionizada, os rizomas descascados e cortados manualmente e na sequência, dispostas em bandejas para serem secas em estufa com circulação de ar - FABBE, com temperatura de 45 °C  $\pm$  5, por um período de 24 horas.

FIGURA 7 – RIZOMA, FOLHA E FLOR DE *CURCUMA LONGA* L. UTILIZADAS NESTE TRABALHO



FONTE: a Autora (2022).

Por fim, estas foram trituradas em moinho de facas, resultando em um pó classificado de acordo com sua granulometria em peneira de 28 mesh. Os triturados foram embalados à vácuo e armazenados ao abrigo da luz em refrigerador com temperatura em torno de 3 °C, até serem utilizados nas análises.

### 3.2 PREPARO DOS SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS (DES)

Para o preparo dos solventes eutéticos profundos utilizados neste trabalho foi empregado o método de aquecimento e agitação, descrito por Dai (2013a). Os reagentes utilizados, quando sólidos, foram previamente secos em estufa e mantidos em dessecador à vácuo até sua utilização para controle da umidade.

A partir do cálculo prévio das massas, HBA e HBD foram pesados em balança analítica (Mettler Toledo modelo AL204), atendendo as frações molares definidas. A mistura foi disposta em um banho-maria com agitação orbital tipo Dubnoff com temperatura de 50 – 70 °C. A temperatura a ser definida dependeu das características do HBD. Para HBDs líquidos em temperatura ambiente foi utilizado 50 °C e para os sólidos 70 °C. Em ambos os casos, a rotação do banho foi fixada em 220 rpm. As amostras foram mantidas no banho até a formação de um líquido transparente e homogêneo.

Por fim, os DES foram mantidos em dessecador até atingirem o equilíbrio térmico com o ambiente, armazenados em frascos âmbar e acondicionados em estufa com temperatura de 45 °C.

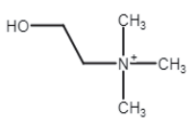
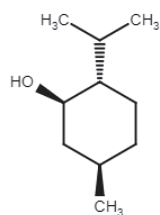
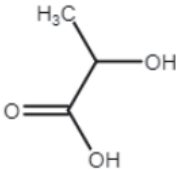
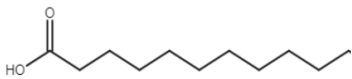
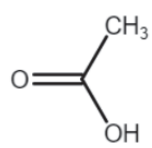
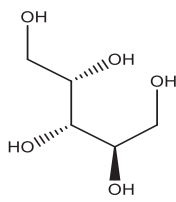
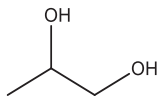
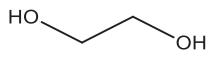
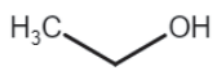
A abreviação, referente as misturas de HBA + HBD com as respectivas frações molares dos DES preparados e utilizados no trabalho, estão descritos na TABELA 2.

TABELA 2 – ABREVIÇÃO, MISTURAS E FRAÇÃO MOLAR DOS DES UTILIZADOS

ABREVIÇÃO	HBA + HBD	FRAÇÃO MOLAR
Men:Lac	Mentol + Ácido Láctico	2:1
Men:Lau	Mentol + Ácido Láurico	2:1
Men:Ac	Mentol + Ácido Acético	1:1
[Ch]Cl:Lac	Cloreto de Colina + Ácido Láctico	1:2
[Ch]Cl:Ac	Cloreto de Colina + Ácido Acético	1:2
DES1	Cloreto de Colina + Etileno glicol	1:3
DES2	Cloreto de Colina + 1,2-Propanodiol	1:2
DES3	Cloreto de Colina + Xilitol + 10% água (m/m)	2:1

FONTE: a Autora (2022).

TABELA 3 – REAGENTES UTILIZADOS NO PREPARO DOS DES, ESTRUTURA MOLECULAR, MASSA MOLAR, NÚMERO CAS, PUREZA (%) E FORNECEDOR

REAGENTE	ESTRUTURA MOLECULAR	MASSA MOLAR (g/mol)	NÚMERO CAS	PUREZA (%)	FORNECEDOR
Cloreto de Colina		139,62	67-48-1	98,0	Alamar Tecnológica® (Diadema, SP, Brasil)
Mentol		156,27	89-78-1	98,0	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO USA)
Ácido Láctico		90,08	52-21-5	99,8	Neon® (São Paulo, SP, Brasil)
Ácido Láurico		199,31	143-07-7	98,0	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO USA)
Ácido Acético		59,05	64-19-7	99,8	Panreac® (Barcelona, Spain)
Xilitol		152,15	87-99-0	98,0	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO USA)
1,2-Propanodiol			57-556	99,5	Sciavicco (MG, Brasil)
Etileno glicol			107-21-1	99,5	Sinth (São Paulo, Brasil)
Etanol		45,06	64-17-5	99,8	Neon® (São Paulo, SP, Brasil)

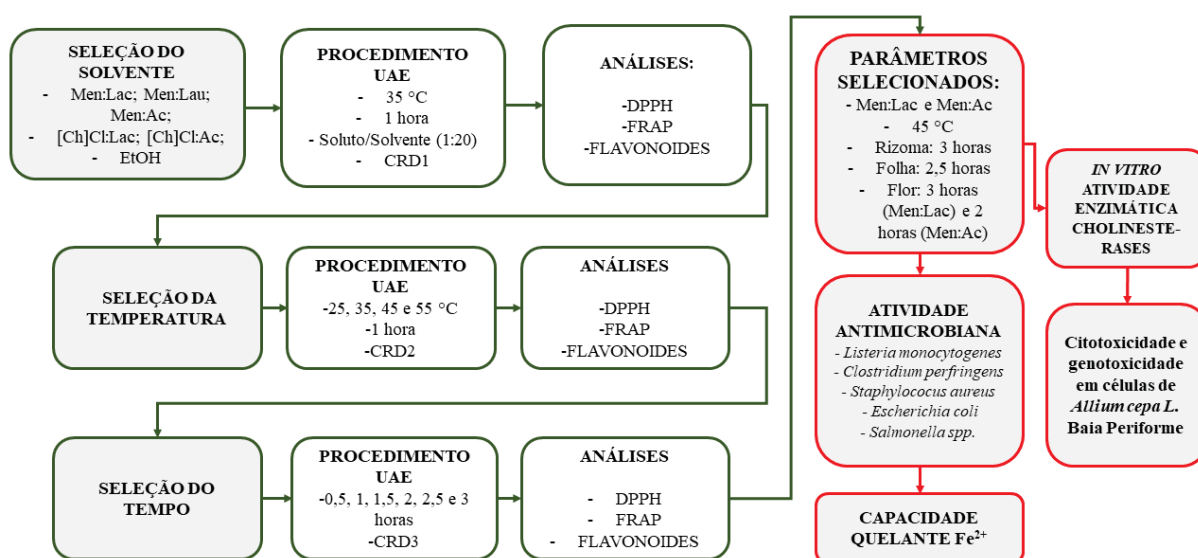
FONTE: ChemSpider (2020).

### 3.3 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NA PLANTA DE *CURCUMA LONGA* L.

#### 3.3.1 Extração sólido-líquido assistida por ultrassom

As amostras em pó do rizoma, folha e flor foram acondicionadas em frascos âmbar e misturadas individualmente nos solventes (etanol (EtOH) e DES, conforme TABELA 3, exceto DES formado por cloreto de colina + xilitol) na proporção de 1:20 (massa/volume). Foi utilizado um banho ultrassônico de 40 Hz (FS30D, Fisher Scientific Co., Massachusetts, EUA), no qual a mistura foi imersa na temperatura desejada, incerteza de  $\pm 2$  °C. Após os tempos estabelecidos, os extratos finais foram transferidos para tubos *ependorfs* e centrifugados (Thermo Scientific, Microcentrifuge Heraeus™ Fresco™ 21, UK) a 9500 rpm durante 3 minutos. Para permitir a determinação das melhores condições de operação, como solvente, temperatura e tempo de extração, foram realizados três CRD (do inglês - *completely randomized design*), por meio dos resultados obtidos nas análises de DPPH, FRAP e flavonoides totais, conforme mostra a FIGURA 8.

FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA PLANTA *CURCUMA LONGA* L. E APLICAÇÃO DOS EXTRATOS



FONTE: a Autora (2022).

Inicialmente, para seleção dos solventes, foi aplicado o CRD1, com um tratamento ou variável (solvente), em seis níveis. Considerando três repetições, foram

18 observações para cada parte da planta. Os parâmetros de tempo e temperatura foram fixos, dessa forma, as amostras foram mantidas em banho de ultrassom por uma hora à temperatura de 35 °C. No CRD1, os solventes que apresentaram os maiores rendimentos em termos de DPPH, FRAP e teor de flavonoides totais foram selecionados para a próxima etapa.

Em seguida, o CRD2 foi aplicado para determinar a temperatura ótima de extração. Dois solventes e quatro temperaturas (25, 35, 45 e 55 °C) foram avaliados neste CRD. Considerando três repetições, houve um total de 24 observações para cada parte da planta. Como na etapa anterior, as extrações foram realizadas em banho de ultrassom por uma hora. Considerando os resultados das análises de DPPH, FRAP e do teor de flavonoides totais, a temperatura ótima de extração que apresentou melhor desempenho foi selecionada para a última etapa.

Finalmente, um terceiro CRD foi aplicado para avaliar o tempo de extração, sendo utilizados dois tratamentos (solvente e tempo). Dois solventes e seis tempos de extração (0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3 horas) foram utilizados neste CRD. A temperatura foi fixada a partir dos resultados obtidos na etapa anterior. Considerando as três repetições, foram necessárias 36 observações para cada parte da planta. Após a seleção do solvente, temperatura e tempo de extração, foram avaliados os potenciais quelante de ferro e antibacteriano dos extratos.

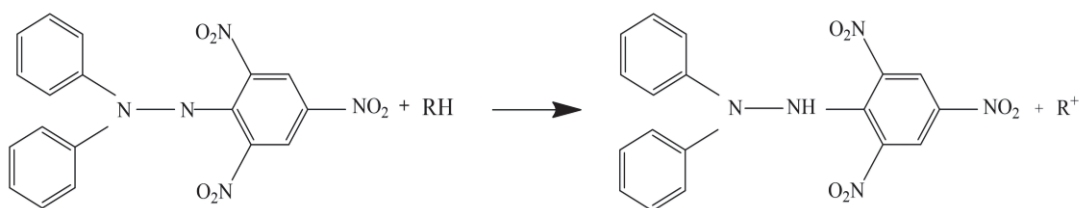
### 3.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E FLAVONOIDES TOTAIS

Para seleção do solvente, temperatura e tempo de extração foram realizadas as análises de antioxidantes e flavonoides totais nos extratos obtidos, conforme descrito abaixo. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Diversas metodologias para a determinação dos compostos antioxidantes são descritas na literatura. Neste estudo duas foram empregadas, sendo estas: o método de sequestro de radicais (DPPH 2,2-difenil-1-picril-hidrazila), que se baseia na captura do radical orgânico, e o método de redução do ferro (FRAP do inglês *Ferric Reduction Antioxidant Power*) que se baseia no potencial de redução do metal.

Na análise de DPPH, segundo Brand-Williams et al. (1995), primeiros autores a descrever o método, este consiste na estabilização do radical livre DPPH<sup>\*</sup> pela ação de um antioxidante, resultando na transição de cor violeta escuro para violeta claro, esta reação é descrita na FIGURA 9.

FIGURA 9 - CAPTURA DO DPPH• PELA AÇÃO DE UM ANTIOXIDANTE

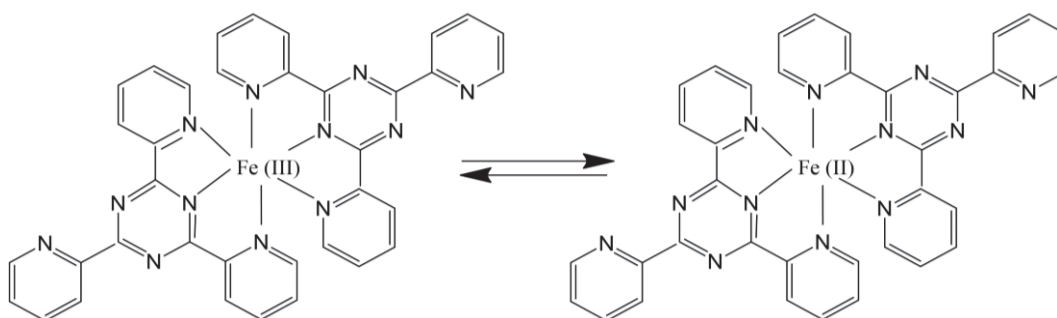


FONTE: Medeiros, (2013).

Inicialmente, uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  do extrato diluído em etanol foi transferida para tubos de ensaio já preparados com 1,95 mL de solução metanólica de DPPH 0,024 g/L. Estes foram agitados com auxílio de um vortex, após a agitação, os tubos foram mantidos ao abrigo da luz em repouso durante 30 minutos. Na sequência, foram conduzidos para leitura da absorbância em um espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu®) em comprimento de onda de 517 nm. Os resultados das leituras foram expressos em  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox. $\text{L}^{-1}$  ( $y = 4,8582x + 10,698$ ;  $R^2 = 0,9907$ ), seguindo a metodologia descrita por Miller e colaboradores (1993) considerando as modificações de Rufino e colaboradores (2010).

O método FRAP, consiste na redução do Fe (III) em Fe (II), tendo a percepção visual da transição de cor azul clara para azul escura. Na presença de um antioxidante, há formação do 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ). A reação ocorrida é mostrada na FIGURA 10.

FIGURA 10 - REDUÇÃO DE FE (III) À FE (II) NO COMPLEXO TPTZ



FONTE: Medeiros, (2013).

A capacidade antioxidante do extrato é determinada segundo metodologia de Benzie e Strain (1996). Em tubos de ensaio, previamente preparados, foram adicionados 45  $\mu\text{L}$  de extrato diluído em etanol, 135  $\mu\text{L}$  de água e 1,35 mL do reagente FRAP. Em seguida a amostra foi agitada em vórtex e mantida sob abrigo de luz durante 30 minutos. Na sequência, foi realizada a leitura em espectrofotômetro de UV-

Vis em 595 nm. Os resultados foram expressos em mg de sulfato férrico por g de amostra sample ( $y = 358.89x - 26.421$ ;  $R^2 = 0.9902$ ).

O teor de flavonoides totais foi determinado conforme metodologia proposta por Prommuak; De-Eknamkul; Shotipruk (2008). Em tubos de ensaio foram adicionados de 250  $\mu\text{L}$  de extrato diluído em etanol, 50  $\mu\text{L}$  de solução de cloreto de alumínio 10% ( $\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$ ), 50  $\mu\text{L}$  de acetato de potássio ( $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e 1,4 mL de água. A mistura foi agitada em vórtex e mantida ao abrigo da luz por 30 minutos. Após esse período, foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV-Vis em comprimento de onda de 414 nm. Os resultados foram expressos em mg de quercetina por g de amostra ( $y = 153.30x + 1.4853$ ;  $R^2 = 0.9914$ ).

### 3.4.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

A Análise de Componentes Principais (PCA – do inglês *Principal component analysis*) foi usada para explorar a relação entre as condições de extração experimental utilizadas e os resultados da capacidade antioxidante e flavonoides totais. A PCA foi realizada com MATLAB R2015b (MathWorks Inc., Natick, MA, EUA). Para tanto, os resultados do primeiro e do segundo CDRs (resultados das análises de DPPH, FRAP e Flavonoides totais), bem como as variáveis de formulação definidas (tipo de solvente, parte da planta e temperatura), foram colocados em colunas e as corridas experimentais utilizadas como linhas. Antes da análise, foi construída uma matriz escalonada por meio da média centrada dividida pela variância dos resultados. Os primeiros componentes principais com autovalores superiores a 1,0 foram usados para avaliar a distribuição das amostras e o novo espaço de projeção (Szydłowska-Czerniak et al., 2011). Em seguida, uma detecção de *outlier* foi realizada usando a distância de *Mahalanobis* com os componentes principais selecionados. Finalmente, a pontuação do PCA foi usada para determinar se os extratos poderiam ser agrupados em diferentes regiões.

## 3.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Após a seleção das condições ótimas de extração pelo PCA, algumas atividades biológicas dos extratos foram avaliadas, indicando o potencial dos extratos para as indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. Foram avaliados os potenciais quelantes de ferro e antibacterianos, além do percentual de inibição das

atividades das enzimas acetil e butiril colinesterase, citotoxicidade e genotoxicidade em células de *Allium cepa* L., inibição das atividades das enzimas  $\alpha$ -amilases salivar humana e pancreática suína.

### 3.5.1 Atividade quelante do íon de Ferro<sup>2+</sup>

A atividade quelante do íon Fe<sup>2+</sup> foi determinada de acordo com o método proposto por Ak e Gülçin (2008) e Gülçin (2006). Os ensaios foram realizados com as devidas diluições dos extratos em etanol. Em tubos de ensaio foram adicionados 2 mL da amostra diluída, 0,2 mL de sulfato de amônio ferroso Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 mmol), 0,4 mL de ferrozina (5 mmol) e etanol completando o volume para 10 mL. A mistura foi incubada ao abrigo da luz por 30 minutos. Por fim, foi realizada a leitura em espectrofotômetro de UV-Vis em comprimento de onda de 562 nm.

A atividade quelante do ferro foi determinada em porcentagem, conforme a Equação (1), por meio das absorbâncias do controle e da amostra,  $Abs_{controle}$  e  $Abs_{amostra}$ , respectivamente, além disso expresso em mg EDTA.mL<sup>-1</sup>.

$$\text{Capacidade quelante Fe}^{2+}(\%) = \left[ \left( \frac{Abs_{controle} - Abs_{amostra}}{Abs_{controle}} \right) \right] * 100 \quad (1)$$

### 3.5.2 Atividade antimicrobiana

Para a determinação da atividade antimicrobiana, foram seguidas as instruções determinadas pelo CLSI (do inglês - *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI, 2017). As cepas de bactérias foram selecionadas devido à sua importância no processamento de alimentos, sendo elas: (*Listeria monocytogenes* (ATCC® 7644™), *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), *Clostridium perfringens* (ATCC® 13124™), *Salmonella sp.* (ATCC® 13076™) e *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™).

Inicialmente, as bactérias foram reativadas em caldo *Mueller Hinton* e plaqueadas em ágar *Mueller Hinton*. Estes extratos foram transferidos em solução salina com uma concentração de 0,85% até formação de 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Em seguida, 20  $\mu$ L do extrato diluído foram gotejados em discos brancos estéreis e depositados em placas com 25 mL de ágar e cada microrganismo inoculado. Além dos extratos com as partes das plantas, para controle foram realizadas as análises com os DES

puros. As placas foram incubadas em estufa na temperatura de 37 °C durante 24 horas.

A determinação da inibição microbiana foi feita através da medição dos halos inibitórios, em milímetros, utilizando um paquímetro digital. A porcentagem de inibição foi calculada com base nos halos de antibióticos encontrados para cada bactéria. Estes foram rotulados como *S = suscetível > 18 mm; I = intermediário 13 a 17 mm e R = resistente < 12 mm*, de acordo com as faixas mínimas de inibição.

### 3.5.3 Análise *in vitro* das atividades enzimáticas da Acetilcolinesterase (AChE) e Butirilcolinesterase (BChE)

Para avaliar a capacidade dos extratos na inibição da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE), foi empregado o método descrito por Ellman e colaboradores (1961). Algumas modificações no método foram realizadas por Hammond e Forster (1989) e Dohi e colaboradores (2009). Como fonte de enzima (S1), foi utilizado homogeneizado de *Drosophila melanogaster* para a BChE e enguia elétrica para a AChE.

Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo inicialmente, adicionado 25 µL do extrato diluído em metanol, 15 µL da enzima (S1) e 60 µL de TKF (tampão fosfato de potássio 100 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,5). As amostras foram incubadas em temperatura de 37 °C por 15 minutos. Na sequência, foram acrescentados 125 µL de DTNB (5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico) e 25 µL das enzimas, AChE ou BChE, nesta etapa foi realizada uma leitura ( $C_i$ ) em um leitor de placas (Thermo-Plate Reader) em comprimento de onda de 405 nm. As amostras foram incubadas ao abrigo da luz por 30 minutos em temperatura ambiente, por fim, foi realizada novamente a leitura ( $C_f$ ). O controle foi realizado com a adição de metanol como branco. A partir dos ensaios, a porcentagem de inibição foi determinada pela Equação (2).

$$Inibição(\%) = 100 - \frac{ABS_{C_f - C_i}}{ABS_{controle}} \times 100 \quad (2)$$

### 3.5.4 Teste *in vivo* da citotoxicidade e genotoxicidade em células do meristema da raiz de *Allium cepa* L.

Os ensaios de *A. cepa* foram realizados com sementes livres de agrotóxicos (variedade Baia Periforme), adquiridas da Isla (Isla Sementes Ltda., Brasil), de acordo com o método proposto por Fiskesjö (1993). Para cada grupo estudado, 10 sementes de *A. cepa* foram continuamente superexpostas em solução aquosa ( $n=3$ ). A germinação ocorreu a  $23 \pm 2$  °C com fotoperíodo de 12:12 horas durante 96 horas. Tanto as sementes quanto as radículas foram expostas aos extratos (DES + rizoma, folhas ou flores de *Curcuma*) quando as radículas começaram a emergir, 48 horas após a colocação das sementes para germinação. Foi considerado um grupo controle negativo baseado em sementes mergulhadas somente em água destilada. As raízes foram coletadas a cada 24 horas e, a cada tempo de exposição, foram avaliadas 3000 células, totalizando 9000 células por grupo de tratamento avaliado.

Um controle positivo foi preparado com metano sulfonato de metila (MMS), substância citotóxica e genotóxica conhecida para o sistema teste de *A. cepa*, na concentração  $4 \cdot 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>. Todas as raízes coletadas durante o experimento foram fixadas em solução 3:1 de Carnoy (etanol:ácido acético) por 24 horas. Para as estimativas do índice mitótico, as células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase foram contadas para determinar o potencial citotóxico. O índice mitótico ou índice de divisão celular foi calculado por meio da Equação (3):

$$MI = 100 \frac{n_{mitosis}}{n_{total}} \quad (3)$$

O potencial genotóxico foi avaliado pela frequência de alterações celulares como micronúcleos, metáfases de colchicina, pontes de anáfase e telófase, ampliações de genes, células com aderências, botões nucleares e anáfases multipolares.

### 3.5.5 Avaliação *in vitro* de inibição da $\alpha$ -amilase salivar humana e pancreática suína

Para a determinação da inibição da atividade enzimática da  $\alpha$ -amilase, foi empregada a metodologia descrita por Da Silva e colaboradores (2014) com

adaptações. Inicialmente, a  $\alpha$ -amilase pancreática (suína) e a  $\alpha$ -amilase salivar humana foram dissolvidas em uma solução tampão de fosfato (40 mmol/L) e NaCl (13,4 mmol/L) com pH de 6,9. Como substrato foi utilizado o amido de batata (concentração de 1% - solubilizado em água destilada). Os extratos de DES foram dissolvidos em etanol. Em tubos de ensaio foram adicionados 100  $\mu$ L ou 240  $\mu$ L de tampão fosfato (20mM + NaCl 6,7 mM),  $\alpha$ -amilase pancreática suína e salivar humana, respectivamente, 150  $\mu$ L ou 10  $\mu$ L enzima, pancreática ou salivar humana, respectivamente, com concentração das enzimas na mistura de 74 U.mL<sup>-1</sup>, 25  $\mu$ L de acarbose e 25  $\mu$ L de água destilada. As amostras foram incubadas em banho maria com temperatura de 37 °C por 15 minutos. Após esse período, foi adicionado 250  $\mu$ L da solução de amido (substrato) e as amostras foram novamente incubadas em banho maria com temperatura de 37 °C por 15 minutos. Na sequência, 500  $\mu$ L de ácido dinitrosalicílico (DNS) foi adicionado na mistura para determinação dos açúcares redutores produzidos pela hidrólise do amido. A mistura foi mantida em banho maria com temperatura de 100 °C por 5 minutos e após esse período foi adicionado 5 mL de água destilada. Por fim, foi realizada a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. As análises foram realizadas em triplicata e a porcentagem de inibição foi calculada pela Equação (4).

$$\text{Inibição (\%)} = 100 - \frac{T_i - B_i}{C_e - B_e} \times 100 \quad (4)$$

Sendo que:  $T_i$  é a média aritmética da absorbância lida no teste de inibição;  $B_i$  é a média aritmética da absorbância lida no branco de inibição;  $C_e$  é a média aritmética da absorbância lida controle da enzima e  $B_e$  é a média aritmética da absorbância lida branco da enzima.

### 3.6 INTERAÇÃO DA $\alpha$ -AMILASE PANCREÁTICA SUÍNA COM A CURCUMINA E EXTRATO

A fim de se obter um melhor entendimento da interação entre a enzima  $\alpha$ -amilase pancreática suína com a curcumina, e o extrato Men:Lac (DES e rizoma), bem como as possíveis alterações na característica da enzima na presença destes compostos, foram empregadas as técnicas de fluorescência, calorimetria de titulação

isotérmica, dicroísmo circular e docking molecular. A descrição da metodologia para o emprego destas técnicas, se encontra nos tópicos a seguir.

### 3.6.1 Fluorescência

As análises de fluorescências foram realizadas em um espectropolarímetro UV-Vis (J-815, Jasco International Co., Tóquio, Japão), acoplado a um controlador de temperatura Peltier (PTP-1). Foi utilizada uma concentração de  $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$  da enzima  $\alpha$ -amilase pancreática suína, adicionada de curcumina com variação de  $5,6 \mu\text{mol.L}^{-1}$  a  $33,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , ou Men:Lac extrato na concentração de  $0,6 \times 10^{-3}$  a  $3,3 \times 10^{-3} \mu\text{L}$  por mL de solução. O comprimento de  $280 \text{ nm}$  foi estabelecido como o comprimento de onda de excitação. Já os sinais de emissão foram registrados de  $300$  até  $450 \text{ nm}$ . Todas as análises foram realizadas em uma temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os brancos apropriados foram subtraídos dos espectros com as amostras para corrigir a fluorescência de fundo. Para a extinção da fluorescência da  $\alpha$ -amilase, foi utilizada a equação de Stern-Volmer, conforme descrito a seguir (Equação (5)).

$$\frac{F_0}{F} + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (5)$$

Onde:  $F_0$  e  $F$  são as intensidades de fluorescência antes e depois da adição do supressor, respectivamente;  $k_q$  é a constante de extinção bimolecular;  $\tau_0$  é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do inibidor;  $[Q]$  é a concentração do inibidor e  $K_{SV}$  é a constante de extinção de Stern-Volmer.

### 3.6.2 Dicroísmo circular (DC)

Para a realização da técnica de dicroísmo circular (DC), foi empregado um espectropolarímetro J-815 CD (Jasco International Co), em comprimento de onda de  $190$  até  $300 \text{ nm}$ , utilizando cubetas de quartzo com percurso óptico de  $0,1 \text{ cm}$  e  $1 \text{ cm}$  de largura. Foi utilizada uma concentração de  $0,5 \mu\text{M}$  da enzima  $\alpha$ -amilase pancreática suína, na presença de  $33,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de curcumina ou  $0,6 \times 10^{-3} \mu\text{L}$  por mL de solução do extrato Men:Lac. Como gás de purga, foi empregado o Nitrogênio, com fluxo de  $10 \text{ L.min}^{-1}$  e, os experimentos foram realizados em duplicata em temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Os resultados foram apresentados como elipticidade do resíduo médio molar ( $\theta_{MRE}$ ) calculado pela Equação (6).

$$\theta_{MRE} = \frac{(\theta - \theta_{control}) \times 100 \times M_{(M)}}{C \times l \times n} \quad (6)$$

Em que:  $\theta$  é o grau de elipticidade (deg);  $\theta_{control}$  é o grau de elipticidade da amostra de controle (tampão ou tampão + inibidor);  $l$  é o comprimento óptico (cm);  $C$  é a concentração ( $\text{mg.mL}^{-1}$ );  $M_{(M)}$  é a massa molar (kDa) e  $n$  é o número de resíduos de proteína. O  $\theta_{MRE}$  é dado em graus  $\text{cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ .

### 3.6.3 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Para avaliar a cinética enzimática da  $\alpha$ -amilase pancreática suína, o método descrito por Kaeswurm e colaboradores (2020), com adaptações foi empregado. Para tal análise, um calorímetro de titulação isotérmica (ITC 200, Microcal Inc., Massachusetts, EUA), foi empregado. Inicialmente, as amostras com as enzimas foram dialisadas em tampão ( $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de tampão de fosfato, pH 6,9,  $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de NaCl), por aproximadamente 18 horas, em uma temperatura de  $5^\circ\text{C}$ , com o auxílio de uma membrana de limite de exclusão de 12kDa (St. Louis, Missouri, EUA). Todas as demais soluções utilizadas na análise, foram preparadas no mesmo tampão utilizado durante a diálise.

Na sequência, após a diálise, foi determinada a concentração da enzima por meio do método descrito por Bradford (1976). As medições de ITC foram realizadas em um experimento de injeção única. A mistura foi mantida por 10 min para atingir o equilíbrio, e, em seguida  $35 \mu\text{L}$  de  $\alpha$ -amilase na concentração de  $0,010 \text{ mg.mL}^{-1}$  foi adicionada, juntamente com  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  do amido de batata na presença de Men:Lac extrato ( $3,3 \times 10^{-9} \text{ L.mL}^{-1}$ ) ou curcumina ( $33,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ).

Durante toda a análise, foram mantidas a temperatura de  $37^\circ\text{C}$  e agitação de 750 rpm. O perfil de calor resultante foi transformado com o auxílio do software Microcal Origin 7.0 (ITC Data Analysis in Origin, MicroCal, LLC, Northampton, MA, U.S.A.) e a taxa de conversão foi representada graficamente contra a concentração de substrato [S]. A taxa da reação ( $R_t$ ) de decomposição do substrato é diretamente proporcional à saída de energia na célula do calorímetro, conforme descrito pela Equação (7).

$$R_t = \frac{P}{\Delta H \times V_0} \quad (7)$$

Onde:  $P$  é a potência gerada pela reação,  $\Delta H$  é o calor de decomposição do substrato e  $V_0$  é o volume da célula.

A constante de taxa catalítica para decomposição do substrato ( $k_{cat}$ ) e a constante de Michaelis ( $K_M$ ) foram calculadas pela Equação (8).

$$R_t = \frac{k_{cat} \times [E]_{cat} \times [S]_t}{[S]_t + K_M} \quad (8)$$

Onde  $[E]_{cat}$  é a concentração total da enzima e  $[S]_t$  é a concentração instantânea do substrato.

#### 6.6.4 *Docking* Molecular

Para a realização do docking molecular, foi preparada a estrutura tridimensional da  $\alpha$ -amilase pancreática suína (PDBid:1HX0) modelada na presença do ligante acarbose pentassacarídeo, conforme o método descrito por Kato-Schwartz e colaboradores (2020). A estrutura modelada resultante foi utilizada como alvo para as simulações de docking envolvendo compostos de curcumina (CID 969516), mentol (CID 1254) e ácido láctico (CID 612).

Três programas foram usados nas simulações: Autodock-v4.2.3 (MORRIS et al., 2009), Molegro-v6.0 (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006) e Vina (TROTT; OLSON, 2009), onde Autodock e Vina foram implementados na interface gráfica PyRx-0.9 (DALLAKYAN; OLSON, 2015). O redocking do ligante de referência, a ascarbose, no complexo de  $\alpha$ -amilase pancreática suína modelado, foi realizado para validar o protocolo de docking para cada programa, onde a validação foi confirmada quando a pose melhor classificada mostrou um desvio quadrático médio abaixo de 2,0 Å, em todas as repetições. A caixa de pesquisa para o Autodock foi centralizada no ligante de referência (dimensão da grade de x, y e z igual a 50) e os parâmetros número de execuções e número de avaliações de energia foram definidos para 50 e 2.500.000, respectivamente. As simulações no Molegro foram realizadas usando um raio de busca de 11 Å centrado no ligante de referência. Foram aplicados o algoritmo de

busca Iterated Simplex e o algoritmo de pontuação Moldock Score [grade], com 10 execuções em cada simulação. Para Vina, a caixa de pesquisa (dimensões de x, y e z foi definida como 20, 15 e 20, respectivamente), centralizada no ligante de referência. Outros parâmetros não mencionados para os três programas foram definidos como padrão. Foram realizadas, no mínimo, quatro repetições para cada programa e analisadas as pontuações médias dos resultados. A pontuação relativa foi calculada conforme proposto por Moreira e colaboradores (2022).

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Shapiro-Wilk ( $p \geq 0,05$ ) verificou a hipótese de normalidade dos dados, além da homocedasticidade, testada pelo teste de Bartlett. A análise de variância (ANOVA) foi aplicada como o teste de LSD (do inglês - *Least Significant Difference*), acessando as diferenças médias ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (repetições;  $n = 3$ ). Statistica® 12.5 e Origin® 8.5 foram utilizados para realização das análises e gráficos. Os resultados de *A. cepa* foram analisados por ANOVA e teste de Scott-Knott com significância de 0,05.

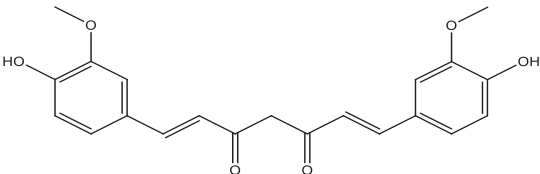
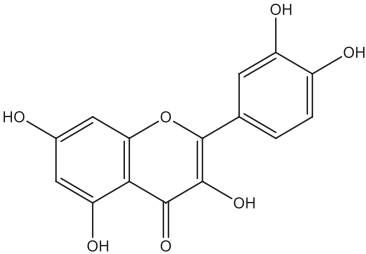
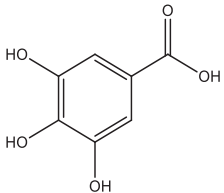
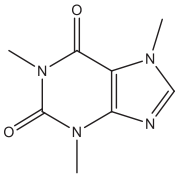
### 3.8 SOLUBILIDADE DE BIOMÓLECUAS EM SOLUÇÕES AQUOSAS

A solubilidade da curcumina, quercetina, ácido gálico e cafeína foi determinada em soluções aquosas contendo alguns aditivos, sendo estes: cloreto de colina; xilitol; etileno glicol; 1,2-propanodiol; DES1, DES2 e DES3. As misturas foram preparadas gravimetricamente utilizando uma balança analítica (AUX320, Shimadzu) com incerteza de na massa de  $\pm 0,0002$  g.

Na TABELA 4 está apresentado o nome, fórmula e estrutura química, número CAS e pureza da curcumina, quercetina, ácido gálico e cafeína, biomoléculas utilizadas neste trabalho.

Para avaliar o efeito das ligações de hidrogênio do DES (foram utilizados os DES1, DES2 e DES3, conforme TABELA 2, na solubilidade das biomoléculas, foi pesados e misturados cloreto de colina e xilitol, etileno glicol e 1,2-propanodiol na mesma razão molar dos DESs. Nesta solução, 30 a 90% em peso % de água foram adicionados e a solubilidade de cada biomolécula avaliada ponto a ponto (não foi possível alcançar a solubilidade completa do cloreto de colina e xilitol em menores teores de água, < 30% em peso).

TABELA 4 – NOME, FÓRMULA E ESTRUTURA QUÍMICA, NÚMERO-CAS E PUREZA DAS BIOMOLÉCULAS AVALIADAS

NOME	FÓRMULA QUÍMICA	ESTRUTURA QUÍMICA	NÚMERO-CAS	PUREZA (%)
Curcumina	$C_{21}H_{20}O_6$		117-39-5	65,0
Quercetina	$C_{15}H_{10}O_7$		458-37-7	95,0
Ácido Gálico	$C_7H_6O_5$		149-91-7	98,0
Cafeína	$C_8H_{10}N_4O_2$		58-08-2	99,0

FONTE: ChemSpider (2020).

### 3.8.1 Determinação da Solubilidade

Para as medidas de solubilidade, cada biomolécula foi misturada em excesso com o solvente, em *ependorfs* previamente identificados. A mistura foi agitada usando um misturador tipo vortex por 2 minutos e mantida em um banho a uma temperatura de 298,2 K (Lab Companion, RW-1025G), com incertezas de 0,2 K, por cerca de 40 minutos para atingir equilíbrio de temperatura. Em seguida, as amostras foram agitadas novamente por 2 minutos e devolvidas ao banho permanecendo por 4 horas. Foram realizados ensaios prévios quanto o tempo de decantação das biomoléculas, esses ensaios confirmaram que esse tempo é suficiente para atingir o equilíbrio.

Após esse período, o sobrenadante foi removido com uma pipeta de vidro Pasteur e transferido para outro *ependorf*. Assim, a concentração da biomolécula em solução saturada foi determinada por espectroscopia UV-Vis (UV-Vis-1800, Shimadzu) no comprimento de onda de 262 nm para ácido gálico, 273 nm para a cafeína, 371 nm para curcumina e 426 nm para quercetina. A concentração das biomoléculas no sobrenadante foi determinada utilizando curvas de calibração previamente estabelecidas. Todas as curvas de calibração apresentaram alto coeficiente de determinação ( $R^2 > 0,9901$ ). Considerando a baixa pureza da curcumina (conforme TABELA 4) a curva de calibração foi realizada considerando a correção deste valor. Devido ao caráter hidrofóbico da curcumina e da quercetina, o etanol foi utilizado como solvente para a obtenção da curva padrão de calibração dessas biomoléculas e água para o ácido gálico.

O modelo COSMO (*Conductor like Screening Model*) foi utilizado para melhor entendimento das interações moleculares e predição da solubilidade das biomoléculas.

### 3.8.2 Modelos tipos COSMO (*Conductor like Screening Model*)

Neste trabalho, o COSMO-RS (do inglês - *Conductor like Screening Model – Real Solvent*) foi utilizado por meio do pacote COSMOtherm® (ECKERT; KLAMT, 2002) com a parametrização BP\_TZVP\_C30\_19.ctd. A otimização da geometria das moléculas foi feita usando o software TurboMoleX (STEFFEN et al., 2010). Para a previsão do COSMO-RS, o cloreto de colina foi otimizado como um par iônico neutro, conforme proposto por Abranches e colaboradores (2019). Além disso, o DES foi tratado como uma mistura binária de HBA e HBD a uma taxa estequiométrica fixa.

Para predição do COSMO-SAC foi aplicado o software JCOSMO desenvolvido por Gerber e Soares (2010), com a parametrização de ligações multi-hidrogênio GMHB1808, disponível gratuitamente em (<https://doi.org/10.5281/zenodo.3613786>) (SOARES et al., 2017). Os perfis sigma foram obtidos com o pacote GAMESS Quantum Chemistry (SCHMIDT et al., 1993) seguindo o procedimento descrito por Ferrarini e colaboradores (2018). Nesse caso, o cloreto de colina foi tratado por seus íons individuais. Após a predição do coeficiente de atividade de diluição infinita das biomoléculas, em diferentes sistemas a 298,2 K, suas solubilidades nos solventes foram avaliadas de acordo com a Equação (9) (SANDLER, 1999).

$$\ln x_i = \frac{\Delta_m H}{R} \left( \frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) - \ln \gamma_i \quad (9)$$

Os percentuais de cargas positivas ( $P^+$ ) e negativas ( $P^-$ ) foram determinados de acordo com a metodologia descrita por Abranches e colaboradores (2020), conforme as Equações (10) e (11).

$$P^+ = \int_{-\infty}^{-0.0082} p(\sigma) \cdot |\sigma| \cdot d\sigma \quad (10)$$

$$P^- = \int_{0.0082}^{+\infty} p(\sigma) \cdot \sigma \cdot d\sigma \quad (11)$$

Os termos  $|\sigma|$  e  $\sigma$  são relacionados à contribuição da área de polaridade de uma dada molécula. Os fatores  $P^+$  e  $P^-$ , Equações (10) e (11), respectivamente, são resultados das somas das áreas positivas e negativas do perfil sigma da molécula, considerando o seguimento da área polar, uma vez que, quanto maior o segmento da área polar, maior é sua contribuição para o valor final de polaridade.

### 3.8.3 Cinética de dissolução da curcumina em soluções aquosas

Para determinação da cinética de dissolução da curcumina em soluções aquosas, descrita no capítulo 5, foram utilizados três solventes, sendo estes: DES2, DES2 + 20% de água (m/m) e DES2 + 80% de água (m/m). A seleção dos solventes, foi feita a fim de realizar uma comparação em alta e baixa concentração de água, bem como no DES puro, visando a observação do tempo de solubilização da curcumina.

Após o preparo do DES2, conforme item 3.2, com o emprego de uma balança analítica (AUX320, Shimadzu) com incerteza de  $\pm 0,0002$  g, as massas de água foram adicionadas no DES2 e agitados. Na sequência, o solvente foi adicionado a uma célula encamisada com uma temperatura de 298,2 K, utilizando um banho (Lab Companion, RW-1025G) para controle de temperatura. A curcumina foi adicionada em excesso com o solvente na célula e uma alíquota foi removida a cada 30 min com um tempo máximo de 240 min. A concentração de curcumina foi determinada com o auxílio de um espectrofotômetro UV-Vis (UV-Vis -1800, Shimadzu) em 426 nm.

## PARTE II

*Resultados e Discussão*

---

## CAPÍTULO 4 – Estudo do processo de extração dos compostos bioativos da *Curcuma longa* L. empregando os DES<sup>1</sup>

---

Neste tópico serão apresentados os resultados obtidos para a determinação das condições ótimas de extração dos compostos bioativos presentes no rizoma, folha e flor da *Curcuma longa* L. e, a partir dos extratos selecionados, resultados das análises de capacidade quelante do íon Fe<sup>2+</sup>, atividade antimicrobiana, atividade inibitória das enzimas acetil e butiril colinesterase, potencial de citotoxicidade e genotoxicidade em células de *Allium cepa* L..

### 4.1 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NA *CURCUMA LONGA* L. (RIZOMA, FOLHA E FLOR)

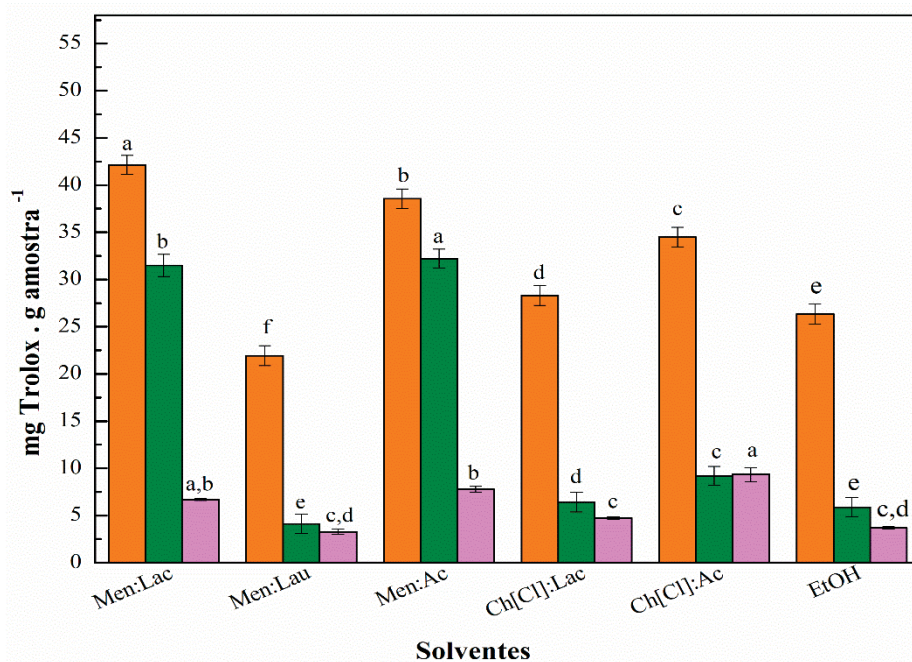
Foram avaliados o efeito de diferentes solventes, temperatura e tempo de extração dos compostos bioativos da *Curcuma longa* L.. A seleção das condições ótimas foi realizada em três etapas e são apresentadas a seguir.

#### 4.1.1 Efeito do Solvente

Na primeira parte deste estudo, para seleção do solvente no processo de extração, foram preparadas cinco diferentes formulações de DES, sendo três hidrofóbicas (mentol + ácido láctico; mentol + ácido láurico; e mentol + ácido acético) e duas hidrofílicas (cloreto de colina + ácido acético e cloreto de colina + ácido láctico). O etanol, por ser muito utilizado como agente extrator dos compostos bioativos da *Curcuma longa* L., foi empregado na comparação com os demais solventes. Na TABELA 3 encontram-se as formulações detalhadas dos solventes aplicados. Os parâmetros de tempo e temperatura foram fixos em 1 hora e 35 °C, respectivamente. Para seleção dos solventes, foram realizadas as análises de DPPH, FRAP e flavonoides totais, conforme apresentado nas FIGURAS 11-13. Os solventes puros também foram submetidos a essas análises para avaliar possíveis interferências nos resultados, porém nenhum apresentou atividade significativa.

<sup>1</sup>Os resultados apresentados foram publicados no trabalho: OLIVEIRA, G.; MARQUES, C.; OLIVEIRA, A.; SANTOS, A. A.; AMARAL, W. INEU, R. P.; LEIMANN; F. V.; PERON, A. P.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R. Extraction of bioactive compounds from *Curcuma longa* L. using deep eutectic solvents: In vitro and in vivo biological activities. **Innov Food Sci Emerg Technol.**, v. 70, 102697, 2021.

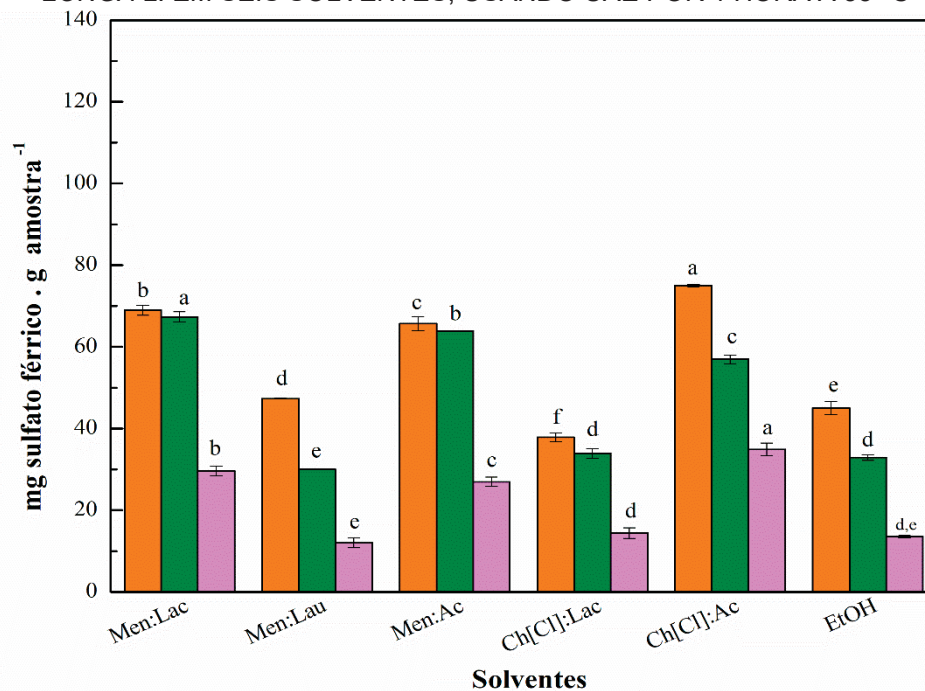
FIGURA 11 - ANÁLISE DE DPPH: (■) RIZOMAS; (■) FOLHAS E (■) FLORES DE *CURCUMA LONGA* L. EM SEIS SOLVENTES, USANDO UAE POR 1 HORA A 35 °C



FONTE: a Autora (2022)

\*As letras acima das colunas representam os resultados da ANOVA (*LSD Fisher*;  $p < 0,05$ ), em colunas da mesma cor, comparadas separadamente para cada análise. Letras iguais não apresentam diferença significativa.

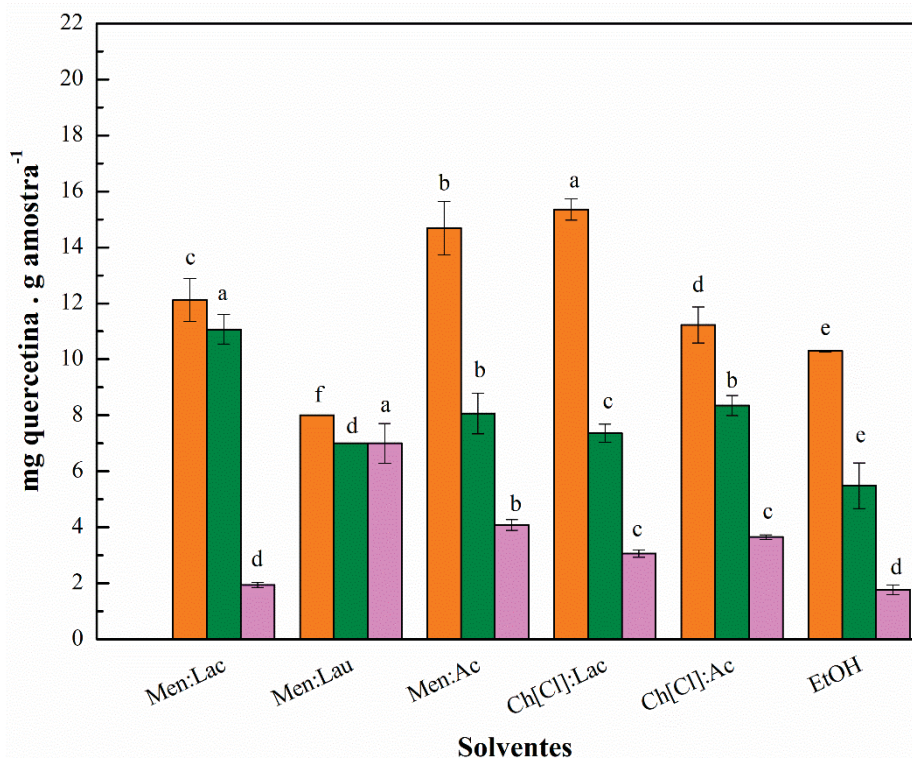
FIGURA 12 - ANÁLISE DE FRAP: (■) RIZOMAS; (■) FOLHAS E (■) FLORES DE *CURCUMA LONGA* L. EM SEIS SOLVENTES, USANDO UAE POR 1 HORA A 35 °C



FONTE: a Autora (2022)

\*As letras acima das colunas representam os resultados da ANOVA (*LSD Fisher*;  $p < 0,05$ ), em colunas da mesma cor, comparadas separadamente para cada análise. Letras iguais não apresentam diferença significativa.

FIGURA 13 - ANÁLISE DE FLAVONOIDES: (■) RIZOMAS; (■) FOLHAS E (■) FLORES DE *CURCUMA LONGA* L. EM SEIS SOLVENTES, USANDO UAE POR 1 HORA A 35 °C



FONTE: a Autora (2022)

\*As letras acima das colunas representam os resultados da ANOVA (*LSD Fisher*;  $p < 0,05$ ), em colunas da mesma cor, comparadas separadamente para cada análise. Letras iguais não apresentam diferença significativa.

Como citado anteriormente, sabe-se que o etanol é amplamente utilizado como solvente na extração dos compostos bioativos presentes na *Curcuma longa* L. (MANDAI et al., 2009; SONI et al., 2011; SHIRSATH et al., 2017; LIU et al., 2019; PATIL; RATHOD, 2020). No entanto, como pode ser observado nas FIGURAS 10-12, o etanol apresentou uma capacidade de extração inferior frente aos outros solventes. Para o rizoma, na análise de DPPH e flavonoides, o etanol apresentou eficiência de extração superior apenas em relação a Men:Lau. No que se refere à análise de FRAP, os valores foram superiores apenas aos resultados encontrados para [Ch]Cl:Lac. Em relação às folhas, nas análises de DPPH e FRAP, o etanol apresentou eficiência de extração superior apenas em relação a Men:Lau e para flavonoides, apresentou os menores valores. Para a flor, o etanol apresentou os menores resultados em todas as análises.

A aplicação do teste ANOVA nos resultados, demonstra que dois DES hidrofóbicos se destacaram frente aos outros solventes, sendo eles o Men:Lac e

Men:Ac. O fato de dois DES hidrofóbicos se destacarem como os solventes mais eficientes, pode estar relacionado com os compostos que constituem, principalmente os rizomas da planta. Nos rizomas da *Curcuma longa* L. encontram-se três principais curcuminoides: a curcumina, a demetoxicurcumina e a bisdemetoxicurcumina, com concentrações de aproximadamente 65, 25 e 13%, respectivamente. A curcumina tem dois grupos aromáticos O-metoxifenólicos, uma fração  $\beta$ -dicarbonil e uma ligação de sete carbonos contendo duas frações enona (NELSON et al., 2017), como pode ser observado na FIGURA 3. Assim, essas características corroboram com os altos rendimentos de extração dos solventes hidrofóbicos destacados, uma vez que os compostos mostrados possuem grupos altamente hidrofóbicos.

Mesmo com as propriedades hidrofóbicas dos curcuminoides e sendo esperado que os solventes selecionados apresentassem melhor desempenho, pode ser observado nas FIGURA 11-13 que o [Ch]Cl:Ac também possui uma alta capacidade de extração de compostos bioativos, principalmente no rizoma. Essas interações polares podem ocorrer com base no mecanismo doador-receptor de prótons, incluindo empilhamento  $\pi$ - $\pi$  e interações hidrofóbicas fracas com o composto alvo, neste caso os curcuminoides (MANOLOVA et al., 2014; MONDAL et al., 2016). Porém, os resultados da análise de DPPH, para amostras de rizoma e folhas, apontam que o DES [Ch]Cl:Ac foi apenas o terceiro melhor solvente, em comparação com os demais utilizados. Dessa forma, para avaliar o efeito da temperatura e do tempo de extração, foram selecionados dois DES hidrofóbicos para serem utilizados nas duas etapas seguintes, sendo esses: Men:Lac e Men:Ac.

#### 4.1.2 Efeito da Temperatura

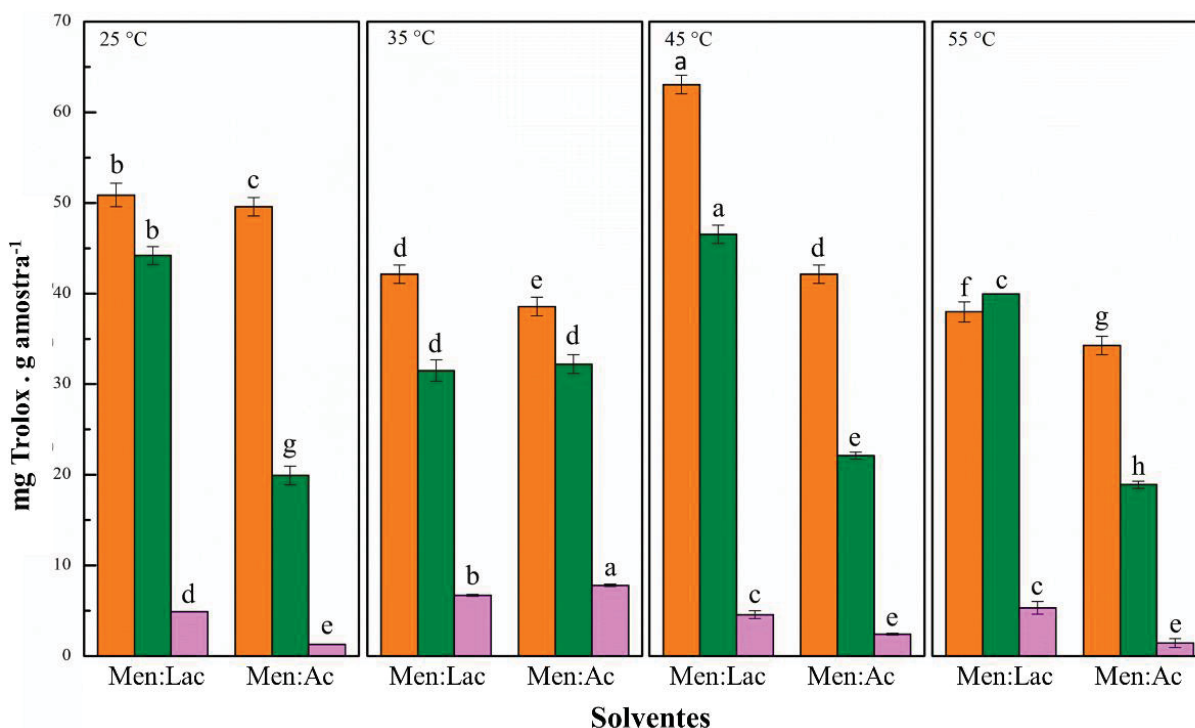
Na segunda etapa do trabalho, foram realizados ensaios com o intuito de avaliar o efeito da temperatura na extração dos compostos bioativos presentes no rizoma, folha e flor da *Curcuma longa* L.. A extração foi realizada em um banho de ultrassom por uma hora utilizando os dois solventes selecionados (Men:Lac e Men:Ac). As temperaturas avaliadas foram de 35, 45, 55 e 65 °C.

Nas FIGURAS 14-16, é perceptível a influência da temperatura utilizada para extração dos compostos bioativos. As análises de DPPH, FRAP e flavonoides totais demonstram que a extração a 45 °C apresenta o melhor desempenho para ambos os solventes. A influência da temperatura durante a extração pode ser notada

principalmente no caso do rizoma e folha, sendo assim mais intensa do que nos dados obtidos para a flor. Amostras de extratos contendo flor apresentaram menor capacidade antioxidante e teor de flavonoides totais quando comparadas àquelas contendo rizoma e folha. Além disso, já se sabe que o aumento da temperatura durante a extração reduz a viscosidade dos solventes, aumentando o contato entre o solvente e os compostos de interesse e a favorecendo difusividade, justificando o aumento na capacidade de extração dos DES (RIBEIRO et al., 2015).

No trabalho desenvolvido por Liu e colaboradores (2019), foi avaliada a capacidade dos DES formados por ácidos orgânicos e açúcares na extração de curcuminoides presente no rizoma da *Curcuma longa* L.. A extração ocorreu nas temperaturas de 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C por 40 minutos. Os autores estabeleceram como condições ótimas na extração a temperatura de 50 °C e tempo de 30 minutos. Acima desse tempo foi possível perceber uma redução na eficiência de extração, fato que pode estar relacionado à decomposição dos curcuminoides, uma vez que estes perdem estabilidade em temperaturas acima de 60 °C (SKERGET et al., 2015).

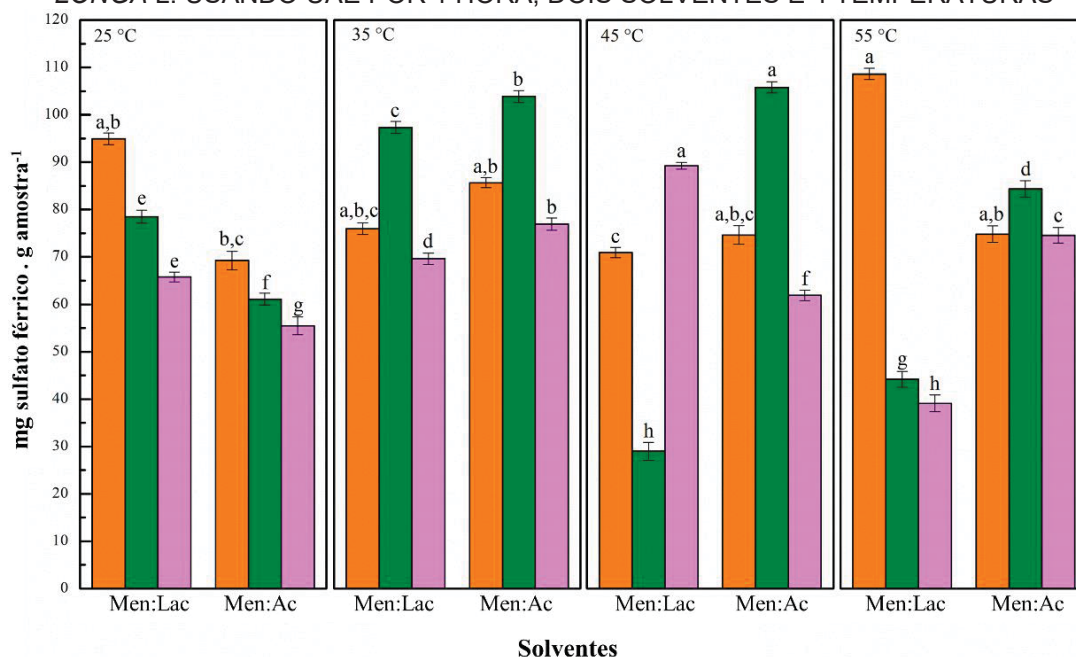
FIGURA 14 - ANÁLISE DE DPPH: (■) RIZOMAS; (■) FOLHAS E (■) FLORES DE *CURCUMA LONGA* L. USANDO UAE POR 1 HORA, DOIS SOLVENTES E 4 TEMPERATURAS



FONTE: a Autora (2022)

\*As letras acima das colunas representam os resultados da ANOVA (LSD Fisher; p < 0,05), comparando colunas da mesma cor para todas as temperaturas. Letras iguais não apresentam diferença significativa.

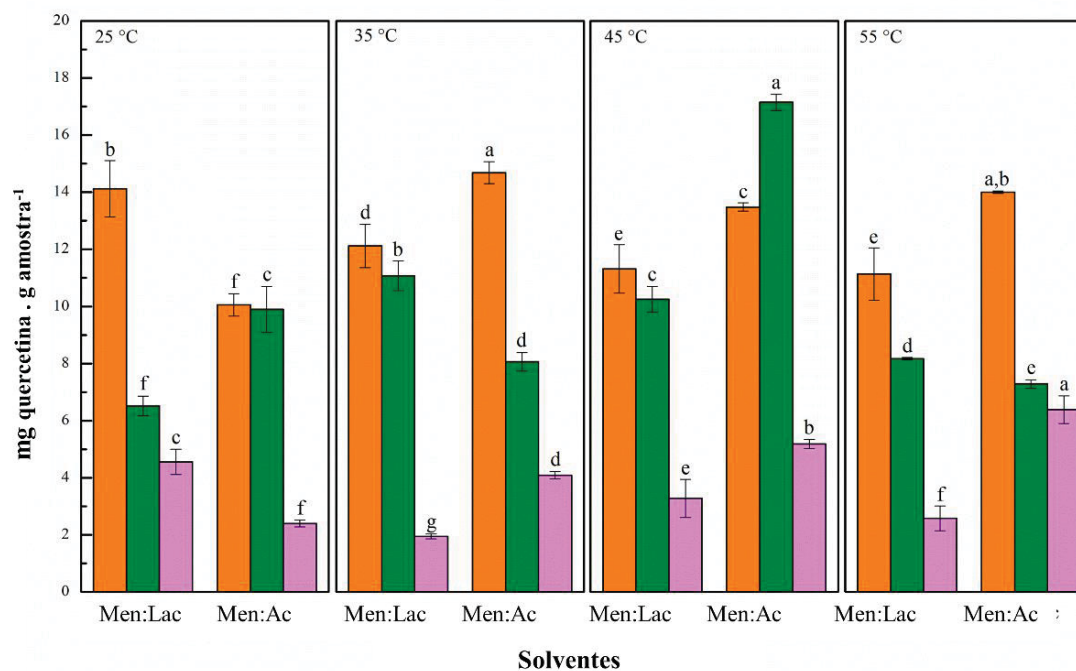
FIGURA 15 - ANÁLISE DE FRAP: (■) RIZOMAS; (■) FOLHAS E (■) FLORES DE *CURCUMA LONGA* L. USANDO UAE POR 1 HORA, DOIS SOLVENTES E 4 TEMPERATURAS



FONTE: a Autora (2022)

\*As letras acima das colunas representam os resultados da ANOVA (LSD Fisher;  $p < 0,05$ ), comparando colunas da mesma cor para todas as temperaturas. Letras iguais não apresentam diferença significativa.

FIGURA 16 - ANÁLISE DE FLAVONOIDES: (■) RIZOMAS; (■) FOLHAS E (■) FLORES DE *CURCUMA LONGA* L. USANDO UAE POR 1 HORA, DOIS SOLVENTES E 4 TEMPERATURAS



FONTE: a Autora (2022)

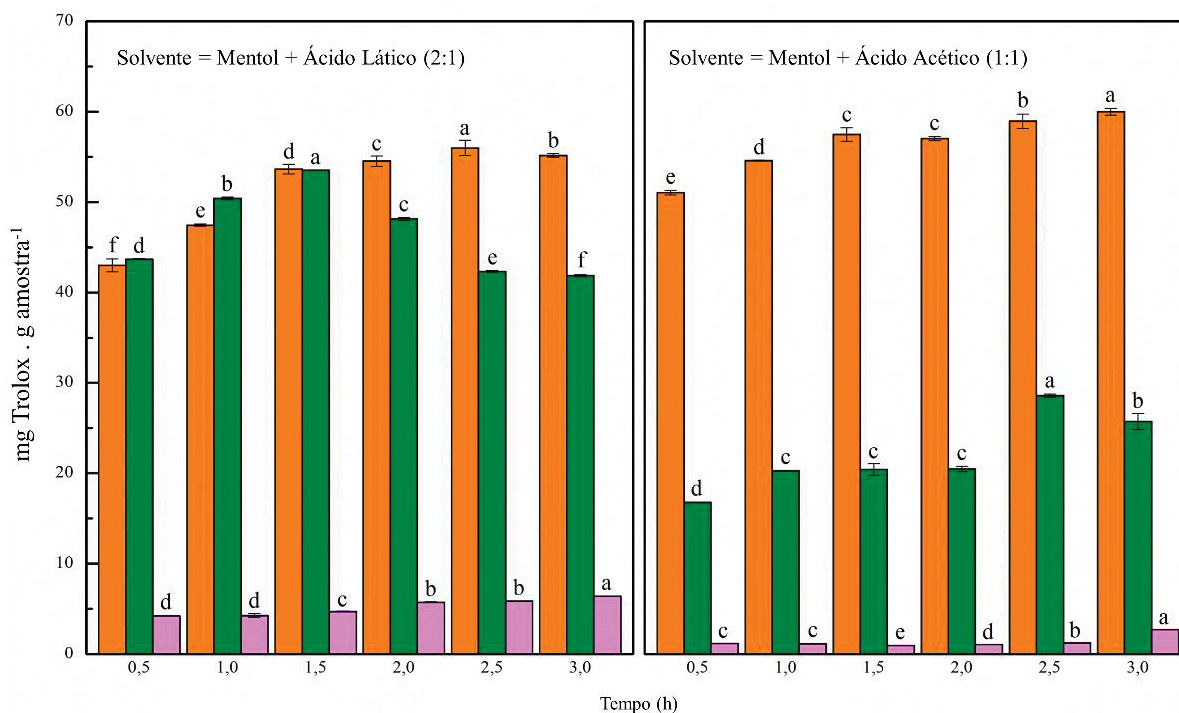
\*As letras acima das colunas representam os resultados da ANOVA (LSD Fisher;  $p < 0,05$ ), comparando colunas da mesma cor para todas as temperaturas. Letras iguais não apresentam diferença significativa.

No presente trabalho, foi possível observar um pico na capacidade de extração em 45 °C com possível degradação em 55 °C. Este fato é mais evidente nos resultados da análise de DPPH (FIGURA 15) e flavonoides (FIGURA 16). Portanto, nesta etapa, a temperatura de 45 °C foi selecionada para realização da cinética de tempo, conforme descrito na sequência.

#### 4.1.3 Efeito do Tempo

Na terceira parte deste estudo, para determinação do melhor tempo, foi realizada a cinética de extração. A extração foi avaliada em intervalos de 30 min até o limite de 3 horas, considerando dois solventes (Men:Lac e Men:Ac) e temperatura de 45 °C (solventes e temperatura selecionados, conforme descrito nas seções anteriores). As FIGURAS 17-19 mostram os resultados de DPPH, FRAP e flavonoides, respectivamente, para rizomas, folhas e flores, exibindo o perfil cinético encontrado.

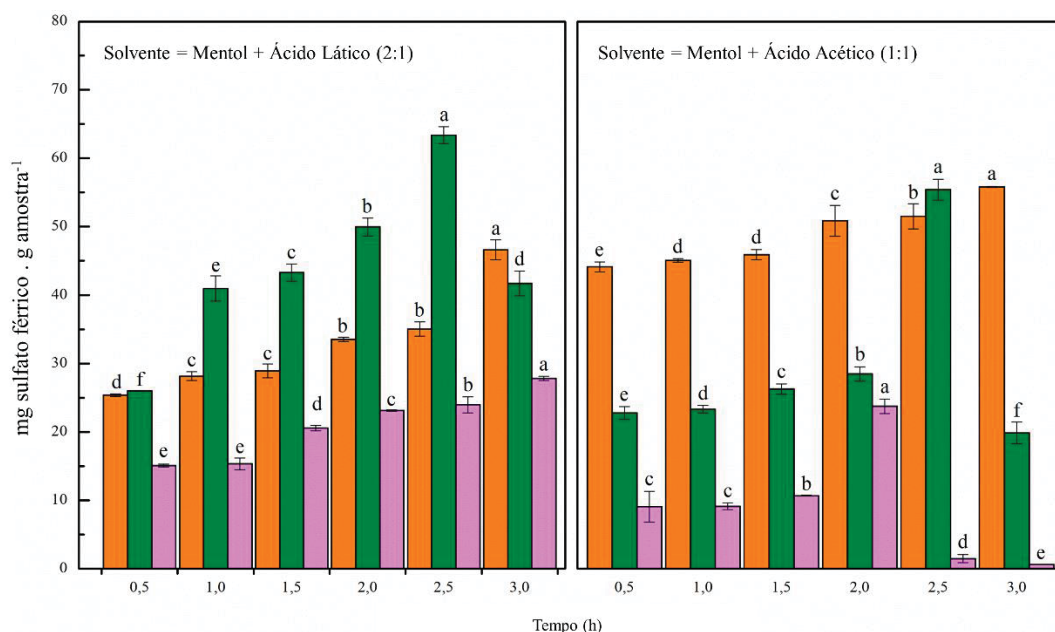
FIGURA 17 - ANÁLISE DE DPPH: (■) RIZOMAS; (■) FOLHAS E (■) FLORES DE *CURCUMA LONGA* L. USANDO UAE, DOIS SOLVENTES, 45 °C E SEIS TEMPOS



FONTE: a Autora (2022)

\*As letras acima das colunas representam os resultados da ANOVA (LSD Fisher; p < 0,05), comparando colunas da mesma cor para cada tempo. Letras não apresentam diferença significativa.

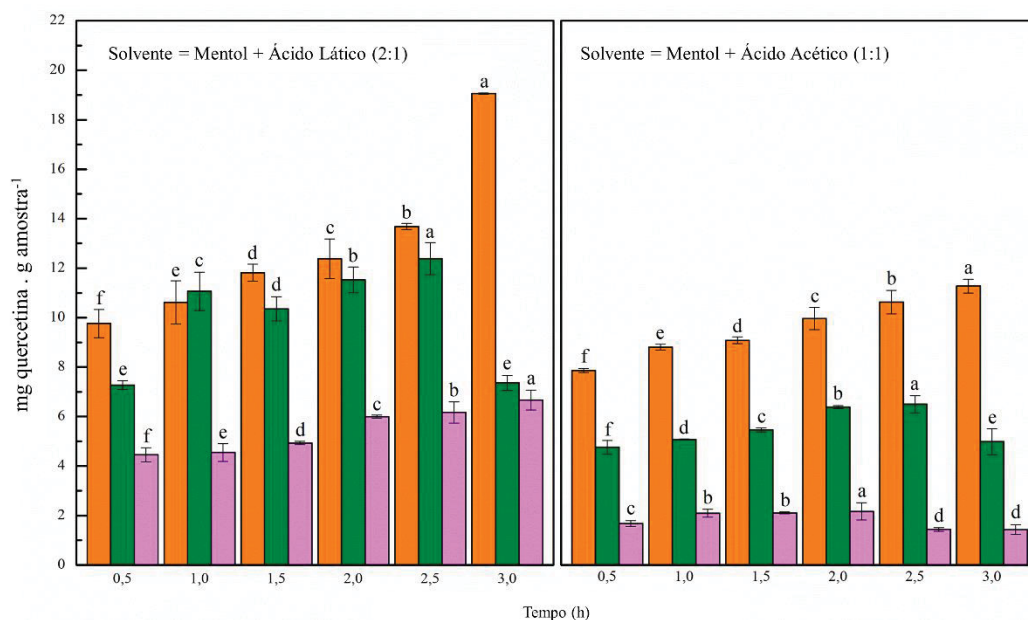
FIGURA 18 - ANÁLISE DE FRAP: (■) RIZOMAS; (■) FOLHAS E (■) FLORES DE *CURCUMA LONGA* L. USANDO UAE, DOIS SOLVENTES, 45 °C E SEIS TEMPOS



FONTE: a Autora (2022)

\*As letras acima das colunas representam os resultados da ANOVA (LSD Fisher;  $p < 0,05$ ), comparando colunas da mesma cor para cada tempo. Letras não apresentam diferença significativa.

FIGURA 19 - ANÁLISE DE FLAVONOIDES: (■) RIZOMAS; (■) FOLHAS E (■) FLORES DE *CURCUMA LONGA* L. USANDO UAE, DOIS SOLVENTES, 45 °C E SEIS TEMPOS



FONTE: a Autora (2022)

\*As letras acima das colunas representam os resultados da ANOVA (LSD Fisher;  $p < 0,05$ ), comparando colunas da mesma cor para cada tempo. Letras não apresentam diferença significativa.

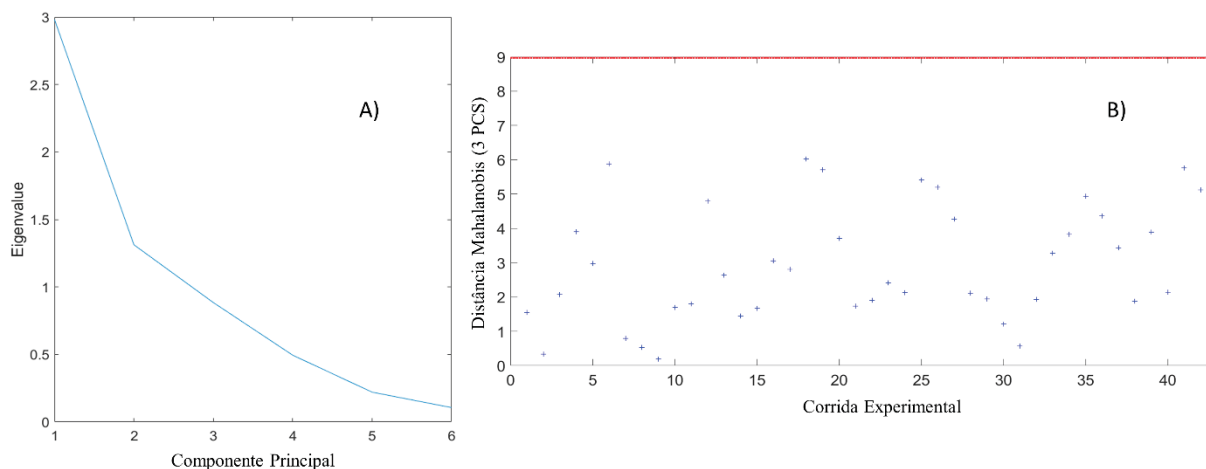
Nas FIGURAS 17-19, para as três análises, é possível observar no intervalo avaliado há a presença de ponto de máximo nos valores obtidos. Estas foram obtidas nos tempos de 3 horas para o rizoma nos dois solventes. Os extratos contendo folha e flor apresentaram comportamento ligeiramente diferente. Para a folha, em ambos os solventes, o maior rendimento de extração foi observado em 2,5 horas, enquanto que para a flor com a aplicação do Men:Lac foi encontrado um tempo ótimo de 3 horas e para o Men:Ac de 2 horas. Conforme esperado, houve um aumento e um pico no rendimento de extração de compostos bioativos ao longo do tempo. Ao passar do tempo, e com a interação e contato de soluto/solvente, ocorre a difusão dos composto até que seja alcançada a saturação do solvente, dessa forma, é determinado o tempo ótimo de extração (LADOLE et al., 2018). Além disso, a utilização do método de ultrassom intensifica os processos de transferência de massa, com consequente redução no tempo de extração (KULKARNI; RATHOD, 2014; RATHOD; RAO, 2015).

Para auxiliar no entendimento e seleção dos resultados, foi realizada a análise de PCA, conforme descrito na seção seguinte.

#### 4.2 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

Com intuito de selecionar as melhores condições do processo de extração, com base no conteúdo de DPPH, FRAP e flavonoides, foi aplicada a análise de componentes principais (PCA). O *scree plot* de autovalores em função das novas dimensões do espaço de projeção é apresentado na FIGURA 20(A). Os três primeiros componentes principais apresentaram autovalores maiores que 1, sendo então selecionados para explorar o novo espaço de projeção. Nenhum *outlier* pôde ser detectado entre as amostras avaliadas para os três primeiros componentes (FIGURA 20 (B)) pelo gráfico de distância de Mahalanobis. O gráfico de cargas do PCA é apresentado na FIGURA 21 e o gráfico de escores de PC1 *versus* PC2 é apresentado na FIGURA 22. Pode-se notar que o primeiro componente é responsável por explicar 49,70% da variabilidade dos dados e o segundo componente 21,87%. Assim, PC1 e PC2 explicam a maior parte da variância total (totalizando cerca de 72%).

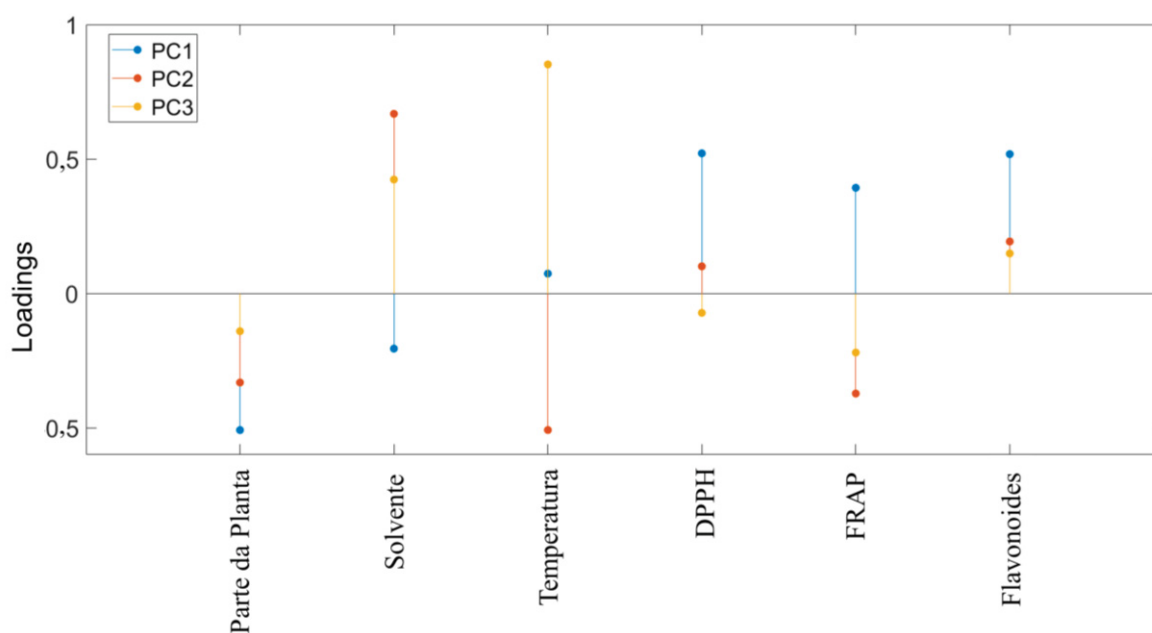
FIGURA 20 - A) SCREE PLOT DE AUTOVALORES; B) DISTÂNCIA DE MAHALANOBIS DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS CONSIDERANDO TRÊS COMPONENTES PRINCIPAIS



FONTE: a Autora (2022).

É possível notar que os resultados de DPPH e flavonoides são explicados por uma carga positiva no PC1 e um pequeno valor de carga, próximo à origem, no PC2 (FIGURA 21). Por outro lado, o FRAP é explicado pelo *loading* no lado positivo do PC1 e no lado negativo do PC2. Este grupo é o que apresentou maiores valores de capacidade antioxidante quando submetido a uma faixa intermediária de temperatura de extração (35 a 45 °C).

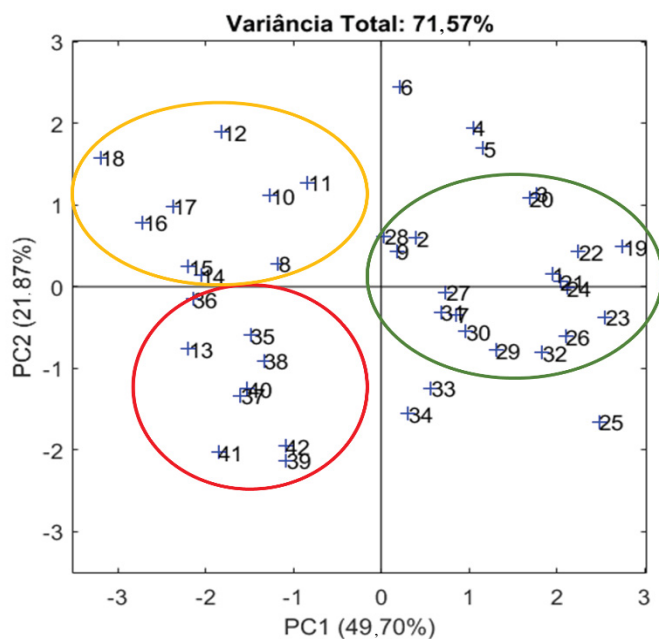
FIGURA 21 - GRÁFICO DE CARGAS DE PCA A PARTIR DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE DPPH, FRAP E FLAVONOIDES E AS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS



FONTE: a Autora (2022).

Três subgrupos podem ser identificados no gráfico de pontuação, onde as execuções experimentais foram reunidas. O grupo representado em verde é explicado principalmente pela temperatura de extração e as capacidades antioxidantes (DPPH, FRAP e flavonoides), conforme FIGURA 22.

FIGURA 22 - GRÁFICO DE PONTUAÇÃO DE PC1 VERSUS PC2 A PARTIR DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE DPPH, FRAP E FLAVONÓIDES E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS



FONTE: a Autora (2022).

Como apresentado na FIGURA 22, o grupo em vermelho é representado pela flor da planta e essas corridas experimentais apresentaram valores inferiores para todas as avaliações da capacidade antioxidante quando comparadas às raízes e folhas. A parte em amarelo é explicado pelo tipo de solvente, sendo que, neste grupo as folhas e flores foram extraídas com [Ch]Cl:Ac e etanol, e apresentaram menores valores de capacidade antioxidante entre todas as amostras testadas.

Dessa forma, para as etapas de determinação da bioatividade e citotoxicidade dos extratos, experimentos do grupo verde e vermelho foram selecionados. Esses dois grupos foram escolhidos devido aos resultados de maior capacidade antioxidante e para testar diferentes partes da cúrcuma, uma vez que no grupo verde apenas raízes e folhas estão presentes, e o grupo vermelho é composto principalmente por partes de flores. As corridas experimentais selecionadas foram: 24, 32 e 39, que representam

rizoma, folhas e flores, respectivamente, extraídos usando: Men:Lac e Men:Ac e temperatura de 45 °C, conforme mostra a TABELA 5.

TABELA 5 - EXECUÇÕES EXPERIMENTAIS AVALIADAS POR PCA. TIPO DE AMOSTRA: 1 - RIZOMA; 2 - FOLHA; 3 - FLOR. SOLVENTE: 1 – Men:Lac; 2 – Men:Lau; 3 – Men:Ac; 4 – [Ch]Cl:Lac; 5 – [Ch]Cl:Ac; 6 – EtOH

EXPERIMENTO	AMOSTRA	SOLVENTE	TEMPERATURA	DPPH	FRAP	FLAVONOIDES
1	1	1	35	42,16	68,76	12,24
2	1	2	35	21,75	47,22	8,28
3	1	3	35	37,86	65,34	14,40
4	1	4	35	28,64	37,50	15,24
5	1	5	35	34,22	74,98	11,30
6	1	6	35	26,40	45,23	10,21
7	2	1	35	31,09	67,66	11,22
8	2	2	35	4,07	29,56	6,98
9	2	3	35	32,18	63,50	8,09
10	2	4	35	6,27	33,48	7,34
11	2	5	35	9,38	56,52	8,34
12	2	6	35	5,75	32,07	5,31
13	3	1	35	6,41	29,63	1,96
14	3	2	35	3,42	11,50	7,16
15	3	3	35	7,46	26,66	4,27
16	3	4	35	4,43	14,32	3,31
17	3	5	35	9,29	33,49	3,66
18	3	6	35	4,91	13,33	1,59
19	1	1	25	50,85	95,03	14,12
20	1	2	25	49,57	69,27	10,02
21	1	1	35	42,09	75,54	12,22
22	1	2	35	38,21	85,68	14,67
23	1	1	45	63,09	71,09	11,17
24	1	2	45	42,09	74,63	13,37

continuação

25	1	1	55	37,55	110,71	11,25
26	1	2	55	34,19	76,01	14,29
27	2	1	25	44,10	78,44	6,42
28	2	2	25	19,74	61,36	9,76
29	2	1	35	31,29	98,23	11,06
30	2	2	35	32,61	103,88	8,35
31	2	1	45	46,49	28,66	10,14
32	2	2	45	22,24	105,74	17,07
33	2	1	55	39,85	44,77	8,14
34	2	2	55	18,51	85,69	7,30
35	3	1	25	4,49	65,46	4,53
36	3	2	25	1,20	55,39	2,26
37	3	1	35	6,45	69,43	1,95
38	3	2	35	7,46	76,75	4,05
39	3	1	45	5,54	89,45	3,30
40	3	2	45	1,26	61,78	5,15
41	3	1	55	5,47	39,49	2,45
42	3	2	55	1,32	75,41	6,35

FONTE: a Autora (2022).

Por meio da análise estatística e de PCA dos resultados obtidos nos ensaios de DPPH, FRAP e flavonoides totais, foram selecionados os seguintes extratos:

- Rizoma + Men:Lac; Rizoma + Men:Ac; Temperatura de 45 °C com 3 horas de extração;
- Folha + Men:Lac; Folha + Men:Ac; Temperatura de 45 °C com 2,5 horas de extração;
- Flor + Men:Lac; Flor + Men:Ac; 3 e 2 horas de extração, respectivamente, e temperatura de 45 °C.

Assim, a partir desses extratos, foram realizadas as análises de bioatividade descritas a seguir. Essas análises foram aplicadas também aos dois DES puros a fim de verificar possíveis interferências dos solventes nos resultados com os extratos.

### 4.3 ANÁLISES BIOLÓGICAS

#### 4.3.1 Atividade quelante do íon de Ferro<sup>2+</sup>

As capacidades de quelação do íon de ferro<sup>2+</sup> obtidas para extratos do rizoma, folha ou flor da *Curcuma longa* L. utilizando Men:Lac e Men:Ac, bem como para o DES puro, são apresentadas na FIGURA 23. O Men:Lac e os extratos exibiram resultados significativamente superior daqueles com Men:Ac. Fica evidente que esse DES puro se destacou na atividade de quelação do ferro. Como os solventes apresentaram maior capacidade quelante quando comparados aos extratos, é possível que tenha ocorrido uma relação com a ocupação dos sítios quelantes dos compostos bioativos no solvente, o que conseqüentemente reduziu a capacidade quelante do ferro. O extrato contendo amostra de DES + flor, mesmo com as menores capacidades antioxidantes e concentração de flavonoides, apresentaram a maior capacidade quelante do íon de Fe<sup>2+</sup>.

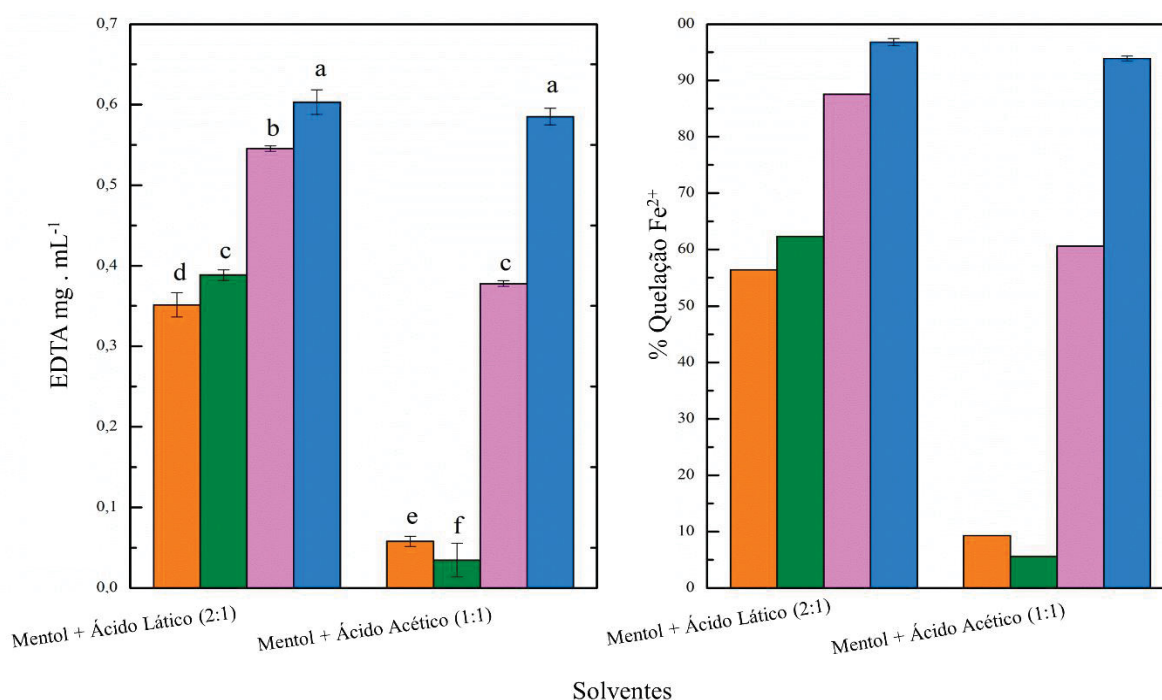
As maiores inibições de quelação do Fe<sup>2+</sup> foram obtidas para o DES puros, que apresentaram valores acima de 95<sup>o</sup>% [Men:Lac] e 90<sup>o</sup>% [Men:Ac]. Na formação do DES foram utilizadas as moléculas de mentol, ácido acético e ácido láctico, sendo esses componentes capazes de formar complexos estáveis com a ferrozina.

Alguns estudos relatados na literatura corroboram com esses resultados. No trabalho realizado por Schimidt e colaboradores (2009), foi possível perceber que óleo de menta, com mentol na composição, agiu como agente eliminador de radicais hidroxila devido a sua capacidade quelante. No trabalho de Begqvist e colaboradores (2006), foi possível perceber que amostras de sucos de cenoura exibiram mais íons Fe<sup>2+</sup> solúveis após a fermentação do ácido láctico e cerca de um terço deles permaneceu estável após a digestão *in vitro*, sugerindo uma proteção dos complexos feitos pelo ácido láctico.

A quelação de metais, como no caso do Fe<sup>2+</sup>, auxilia no enriquecimento de alimentos, proteção do metabolismo da pele contra metais pesados e recuperação de ambientes (água, solo, resíduos industriais) contaminados por metais (CUNHA et al.,

2019). Dessa forma, com os DES e os extratos testados apresentaram alta capacidade de quelação do  $\text{Fe}^{2+}$ , tais resultados sugerem que estes possam ser aplicados em produtos alimentícios e como agentes para descontaminação de metais.

FIGURA 23 – QUELAÇÃO DO  $\text{Fe}^{2+}$  EDTA  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  E % DE QUELAÇÃO EM EXTRATOS DE: (■) RIZOMAS; (■) FOLHAS E (■) FLORES DE *CURCUMA LONGA* L. E DES



FONTE: a Autora (2022)

\*As letras acima das colunas representam os resultados da ANOVA (LSD Fisher;  $p < 0,05$ ) comparando as colunas para ambos os solventes. Letras iguais não apresentam diferença significativa.

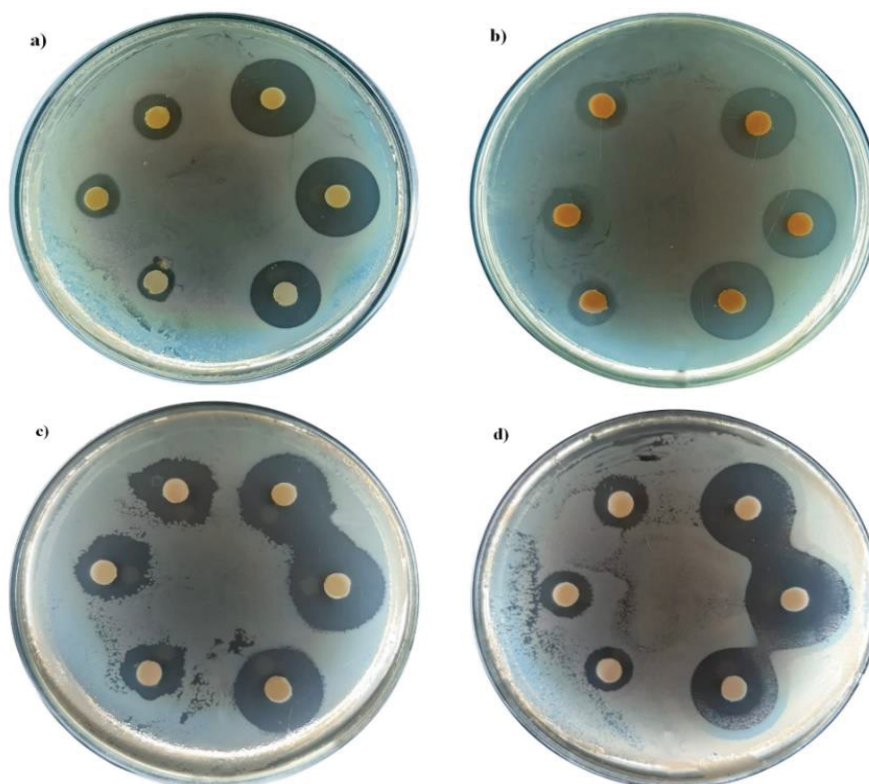
#### 4.3.2 Atividade antimicrobiana

Os resultados da atividade antimicrobiana para os extratos obtidos de rizoma, folha e flor de *Curcuma longa* L., bem como as atividades obtidas para os DES puros (mentol + ácido láctico e mentol + ácido acético), são apresentados na TABELA 6. Na FIGURA 24 é apresentado os resultados para alguns extratos.

Entre as amostras analisadas, destacam-se dezenove ensaios em que exibiram susceptibilidade ( $S \Rightarrow 17$  mm) (TABELA 6). Doze eram para bactérias gram-positivas (*Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*) e sete para gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella spp.*). Conforme descrito por Brul e Coote (1999), este fato ocorre devido as bactérias gram-positivas não apresentarem membrana externa em sua estrutura, levando-as a terem uma menor resistência aos

mecanismos conservantes e serem suscetíveis às moléculas pequenas e bioativas intrínseca aos extratos.

FIGURA 24 - PLACAS DE ANÁLISE ANTIMICROBIANAS: a) FOLHA *C. perfringens*, Men:Ac ESQUERDA E Men:Lac DIREITA; b) RIZOMA PARA *E. coli*, Men:Ac ESQUERDA E Men:Lac DIREITA; c) Men:Ac ESQUERDA E Men:Lac DIREITA PARA *Listéria*; d) Men:Ac ESQUERDA E Men:Lac DIREITA PARA *Salmonella sp.*



FONTE: a Autora (2022).

Até o presente momento, não foram encontrados na literatura trabalhos semelhantes a este. O extrato obtido da folha empregando Men:Ac como solvente apresentou atividade que pode ser comparada estatisticamente ao antibiótico. A comparação da inibição da amostra com o antibiótico, gerou percentuais acima de 50% para a maioria das amostras, exceto para o Men:Ac, e extratos de rizoma obtidos a partir de ambos os DES, considerando a bactéria *C. perfringens*. Observando os percentuais, a bactéria mais inibida foi a *L. monocytogenes*, da amostra Men:Lac (valores em negrito na TABELA 6), principalmente para extrato de folha e flor. Na análise de quelação do  $Fe^{2+}$  foram obtidos resultados semelhantes.

TABELA 6 - CAPACIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE DES E RIZOMA, FOLHA E FLOR DE CURCUMA LONGA L. E DES PURO

BACTÉRIA	Extrato + Men:Lac									
	RIZOMA (mm)	R/I/S	%	FOLHA (mm)	R/I/S	%	FLOR (mm)	R/I/S	%	
<i>Listeria monocytogenes</i>	21,44 <sup>d</sup> ±0,36	S	75,54	<b>23,70<sup>c</sup>±0,09</b>	<b>S</b>	<b>83,54</b>	<b>22,36<sup>c,d</sup>±0,32</b>	<b>S</b>	<b>78,80</b>	
<i>Clostridium perfringens</i>	12,82 <sup>c</sup> ±0,92	R	45,19	17,76 <sup>b</sup> ±0,53	I	62,60	17,76 <sup>b</sup> ±0,53	I	62,60	
<i>Staphylococcus aureus</i>	19,69 <sup>c</sup> ±0,59	S	65,94	21,04 <sup>b,c</sup> ±0,73	S	70,46	21,61 <sup>b</sup> ±0,24	S	72,38	
<i>Escherichia coli</i>	16,82 <sup>c</sup> ±0,28	I	58,25	15,11 <sup>d</sup> ±0,15	I	52,34	18,70 <sup>b</sup> ±0,17	S	64,76	
<i>Salmonella sp.</i>	20,44 <sup>b</sup> ±0,82	S	68,28	18,87 <sup>b</sup> ±0,36	S	63,01	20,27 <sup>b</sup> ±0,37	S	67,71	
BACTÉRIA	RIZOMA (mm)	R/I/S	%	FOLHA (mm)	R/I/S	%	FLOR (mm)	R/I/S	%	
<i>Listeria monocytogenes</i>	14,10 <sup>D</sup> ±0,72	I	49,82	18,14 <sup>B</sup> ±0,07	S	63,94	21,45 <sup>B</sup> ±0,43	S	75,63	
<i>Clostridium perfringens</i>	8,27 <sup>D</sup> ±0,16	R	29,15	14,91 <sup>B,C</sup> ±0,25	I	52,57	15,58 <sup>B</sup> ±0,34	I	54,92	
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,21 <sup>C</sup> ±0,35	I	40,90	<b>29,45<sup>A</sup>±0,67</b>	<b>S</b>	<b>98,71</b>	21,02 <sup>B</sup> ±0,40	S	70,42	
<i>Escherichia coli</i>	12,00 <sup>C</sup> ±0,98	R	41,56	15,76 <sup>B</sup> ±0,94	I	54,57	14,37 <sup>B</sup> ±0,52	I	49,78	
<i>Salmonella sp.</i>	18,61 <sup>B</sup> ±0,24	S	62,16	17,00 <sup>B</sup> ±0,82	I	56,80	19,42 <sup>B</sup> ±0,37	S	64,87	
BACTÉRIA	Men:Lac	R/I/S	%	Antibiótico	R/I/S	%	Men:Ac	R/I/S	%	
<i>Listeria monocytogenes</i>	<b>25,04<sup>P</sup>±0,37</b>	<b>S</b>	<b>88,29</b>	28,37 <sup>aA</sup> ± 0,95	S	100 %	17,58 <sup>B</sup> ±0,51	I	61,97	
<i>Clostridium perfringens</i>	16,38 <sup>b</sup> ±0,77	I	57,76	28,37 <sup>aA</sup> ± 1,66	S	100 %	13,12 <sup>C</sup> ±0,11	I	46,27	
<i>Staphylococcus aureus</i>	22,62 <sup>b</sup> ±0,19	S	75,78	29,86 <sup>aA</sup> ± 0,84	S	100 %	11,57 <sup>C</sup> ±0,71	R	38,77	
<i>Escherichia coli</i>	15,16 <sup>d</sup> ±0,80	I	52,48	28,88 <sup>aA</sup> ± 0,48	S	100 %	10,51 <sup>C</sup> ±0,76	R	36,39	
<i>Salmonella sp.</i>	20,50 <sup>b</sup> ±0,43	S	68,47	28,94 <sup>aA</sup> ± 1,28	S	100 %	11,57 <sup>C</sup> ±0,71	R	38,67	

\*As letras minúsculas referem-se às amostras de DES Mentol + ácido láctico em comparação com o antibiótico e as letras maiúsculas às amostras do DES Mentol + ácido acético em comparação com o antibiótico (ANOVA; teste LSD Fisher, p <0,05).

S = suscetível > 18 mm;

I = intermediário 13 to 17 mm;

R = resistente < 12mm;

FONTE: CLSI, (Institute, Clinical and Laboratory Standards, Wayne, 2017).

Em comparação com os extratos, o Men:Lac apresentou alguns resultados maiores para inibição das atividades dos microrganismos. Devido a presença de mentol e ácido láctico e ausência de outras moléculas para interagir com esses compostos, é possível a ocorrência de interação direta com as bactérias, destacando a capacidade destes compostos de inibir o crescimento dos microrganismos. É sabido que o ácido láctico é inibidor de microrganismo, como a de *Listeria*, *E. coli* e *S. aureus* (DUBAL et al., 2004) e no DES sua concentração foi de 53,6 %, auxiliando no entendimento dos resultados obtidos.

O mentol, outro composto utilizado no preparo do DES, também é empregado para fins de redução do crescimento microbiano por ser eficaz na redução de *E. coli* e do *S. aureus* (TROMBETTA et al., 2005). O mentol é amplamente utilizado como ingrediente em creme dental, indústria do tabaco, desodorizantes bucais, bálsamos analgésicos, pastilhas para tosse, perfumes, gomas de mascar e balas (MAHESHWARI et al., 2006), sendo responsável por reduzir a presença de bactérias nesses produtos.

No presente estudo, os resultados obtidos para avaliação da atividade antimicrobiana demonstraram que a combinação do mentol com ácido láctico ocasionou em significativos efeitos para a inibição do crescimento microbiano. Sendo assim, estes fatos indicam a alta capacidade quanto o potencial de aplicação desses extratos à base de DES.

Desta forma, por meio dos testes em bactérias de interesse na indústria de alimentos, constata-se as possíveis aplicações dos extratos obtidos na preservação de alimentos, revestimentos comestíveis e biofilmes.

#### 4.3.2 Análise *in vitro* das atividades enzimáticas da Acetilcolinesterase (AChE) e Butirilcolinesterase (BChE)

Foram avaliados os efeitos da aplicação dos extratos (DES + rizoma, folha ou flor de *Curcuma longa* L.) sobre a atividade das enzimas acetil e butirilcolinesterase (TABELA 7). Os resultados foram comparados com o controle (100% de atividade).

TABELA 7 - ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ACETIL (AChE) E BUTIRILCOLINESTERASE (BChE) DE EXTRATOS DE DES E RIZOMA, FOLHA E FLOR DE *CURCUMA LONGA* L. E DES PURO (TODOS OS EXTRATOS FORAM DILUÍDOS 100X EM METANOL)

AMOSTRA	RIZOMA		FOLHA		FLOR		DES	
	Men:Lac	Men:Ac	Men:Lac	Men:Ac	Men:Lac	Men:Ac	Men:Lac	Men:Ac
BChE I (%) <sup>*</sup>	84.32± 1.42 <sup>a</sup>	20.85± 2.45 <sup>f</sup>	81.92± 3.80 <sup>c</sup>	21.82± 3.51 <sup>d</sup>	83.79± 3.99 <sup>b</sup>	19.60± 1.79 <sup>g</sup>	59.24± 4.54 <sup>e</sup>	12.65± 3.99 <sup>h</sup>
AChE I (%) <sup>*</sup>	99.24± 0.912 <sup>a</sup>	37.84± 5.31 <sup>e</sup>	99.09± 1.48 <sup>a</sup>	30.43± 4.33 <sup>f</sup>	97.94± 0.55 <sup>b</sup>	6.49± 0.47 <sup>g</sup>	96.30± 0.04 <sup>c</sup>	95.14± 0.85 <sup>d</sup>

\*Porcentagem de inibição em comparação ao controle (média; desvio padrão (DP); n = 4).

As letras acima das linhas representam os resultados da ANOVA (LSD Fisher; p <0,05). Letras iguais não apresentam diferença significativa.

Sob a atividade enzimática da BChE, foi possível perceber que os dois extratos que mais apresentaram efeito inibitório foram o rizoma empregando o Men:Lac e Flor utilizando o Men:Lac, com resultados de 84,32 e 83,79% respectivamente. O menor valor encontrado foi de 12,65%, para o DES Men:Ac puro. Para a enzima AChE destacaram-se os extratos contendo rizoma empregando Men:Lac e folha aplicando o Men:Lac, com resultados 99,24 e 99,09% respectivamente. O menor valor de inibição encontrado foi de 6,49%, a partir da aplicação do extrato composto pela flor e o Men:Ac.

Com relação ao DES puro, foi possível perceber que o Men:Lac apresentou valores de inibição para as enzimas BChE e AChE de 59,24 e 96,30%, respectivamente. Os extratos contendo Men:Lac e todas as partes da planta avaliadas (rizoma, folha e flor), aumentaram o potencial de inibição na atividade de ambas as enzimas neste solvente. Para Men:Ac, a porcentagem de inibição foi de 12,65% para BChE e 95,14% para a AChE. O potencial de inibição da enzima BChE aumentou com a adição de rizoma, folhas e flores. Para a enzima AChE, todos os valores diminuíram.

Até o presente momento, não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliaram o potencial de inibição desses extratos. O efeito da curcumina (extraída de rizoma de cúrcuma) sobre as atividades de AChE e BChE foram testadas por Abbasi e colaboradores (2012) e apresentaram alto potencial de inibição.

A inibição das atividades enzimáticas das colinesterases, como as avaliadas neste trabalho (AChE e BChE), é relevante uma vez que alguns estudos relatam a ligação dessas atividades com a algumas doenças, como envelhecimento, demência e até o Alzheimer (ARAÚJO et al., 2016). Dessa forma, devido alguns extratos

possuíram grande inibição nas atividades enzimáticas, o potencial da aplicação dos extratos fica mais evidente.

#### 4.3.3 Teste *in vivo* da citotoxicidade e genotoxicidade em células do meristema da raiz de *Allium cepa* L.

Foi possível perceber que os extratos testados apresentaram alta capacidade antioxidante, quelação do íon do  $Fe^{2+}$ , inibição do crescimento de microrganismos e capacidade de inibição das atividades enzimáticas das AChE e BChE, demonstrando alto potencial de aplicação em diversos produtos.

Sabe-se que quando ocorre o consumo de agentes citotóxicos e genotóxicos, estes podem interagir com o material genético formando reações oxidativas e até mesmo quebra na molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico). Na maioria dos casos ocorre a reparação pelo próprio organismo ou a célula é eliminada. No entanto, caso essa lesão permaneça, ocorrem alterações hereditárias ao organismo, conhecidas como mutações, que são encontradas nas células filhas durante a replicação (WHITE; RASMUSSEM, 1998; OBE et al., 2004). Quando ocorre a exposição de humanos ou outros organismos a esses agentes, a saúde fica comprometida (CALVIELLO et al., 2005). Dessa forma, análises que determinam a citotoxicidade e genotoxicidade são necessárias para acessar o risco de exposição dos organismos aos compostos estudados (DALLEGRAVE, 2006). Assim, para avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade dos extratos e solventes selecionados nesse trabalho, estes foram aplicados em células de *Allium cepa* L..

Para estes testes foram utilizadas raízes de *Allium cepa* L. por ser esta espécie internacionalmente aceita para testes toxicogenéticos de substâncias de interesse. Os biomarcadores aplicados neste estudo foram o índice mitótico (índice de divisão celular), para avaliar diferentes níveis de citotoxicidade, e a frequência de alterações cromossômicas e do fuso mitótico, para avaliar a genotoxicidade (HERRERO et al., 2012; SILVA et al., 2020).

Os meristemas radiculares de *A. cepa*, foram expostos aos extratos de DES (Men:Lac e Men:Ac) de rizoma, folha ou flor de *Curcuma longa* L., nos períodos de 24 e 48 horas. Os resultados do índice mitótico MI (%) estão apresentados na TABELA 8. Foi possível perceber que não houve diferença entre os MI em todos os tempos de exposição, quando comparado os tratamentos (extratos com rizomas, folhas e flores,

em ambos os solventes). Este fato foi percebido em todas as amostras avaliadas. Portanto, nenhum dos tratamentos avaliados para rizoma, folha, flor, DES e controle causou citotoxicidade às células meristemáticas do meristema da raiz de *A. cepa*.

Vale ressaltar que os tratamentos avaliados não induziram alterações aneugênicas e meristêmicas do fuso celular mitótico da raiz de *A. cepa*, revelando-se não genotóxico, em todos os momentos de avaliação (tempos de 0, 24 e 48 horas). Na FIGURA 25 é apresentado a imagem da divisão celular em células de *A. cepa*, submetidas ao extrato Men:Lac e rizoma, no tempo de 24 horas de exposição.

FIGURA 25 – DIVISÃO CELULAR EM CÉLULAS DE *A. CEPA* L. EXPOSTAS A EXTRATOS DE DES E RIZOMA DE *CURCUMA LONGA* L.



FONTE: a Autora (2022).

Os resultados obtidos por meio de bioensaio de *A. cepa* apresentam boa correlação com os resultados observados em testes genéticos realizados em outros bioensaios, como aqueles com mamíferos e em cultura de células (HERRERO et al., 2012; SALES et al., 2018).

TABELA 8 - ÍNDICES MITÓTICOS (%) E ÍNDICES DE ALTERAÇÕES CELULARES OBSERVADOS EM MERISTEMAS DE RAÍZES DE *A. CEPA* EXPOSTOS A EXTRATOS DE DES DE RIZOMA, FOLHA E FLOR DE *CURCUMA LONGA* L. E DES PURO

ÍNDICE MIOTOTICO (%)				
CONTROLE POSITIVO		MI (%) /SD		
MMS (4x10 <sup>-4</sup> mol/L)		4,78±0,94		
		MP (%) /SD		
	TR	Co (0 h)	24 h	48 h
Rizoma	Men:Lac	28,4±1,77 <sup>a,*</sup>	35,0±1,02 <sup>a,*</sup>	21,9±2,00 <sup>a,*</sup>
	Men:Ac	23,7±3,81 <sup>a,*</sup>	30,3±3,00 <sup>a,*</sup>	30,9±2,90 <sup>a,*</sup>
Folha	Men:Lac	31,4±3,34 <sup>a,*</sup>	22,9±3,77 <sup>a,*</sup>	34,5±2,99 <sup>a,*</sup>
	Men:Ac	35,7±2,07 <sup>a,*</sup>	25,4±3,71 <sup>a,*</sup>	19,7±3,58 <sup>a,*</sup>
Flor	Men:Lac	30,2±2,44 <sup>a,*</sup>	35,4±2,01 <sup>a,*</sup>	39,4±1,99 <sup>a,*</sup>
	Men:Ac	31,8±3,44 <sup>a,*</sup>	25,0±2,69 <sup>a,*</sup>	20,0±2,87 <sup>a,*</sup>
DES	Men:Lac ENCAP2	40,2±3,95 <sup>a,*</sup>	24,0±4,42 <sup>a,*</sup>	27,6±7,21 <sup>a</sup>
	Men:Ac ENCAP2	31,9±1,25 <sup>a,*</sup>	35,9±2,24 <sup>a,*</sup>	28,7±2,87 <sup>a,*</sup>
ÍNDICES DE ALTERAÇÃO CELULAR				
CONTROLE		32,4 ±1,94 <sup>a</sup>	27,7±1,59 <sup>a</sup>	20,6±2,95 <sup>a</sup>
CONTROLE POSITIVO		MI (%) /SD		
MMS (4x10 <sup>-4</sup> mol/L)		4,78±0,94		
		MP (%) /SD		
	TR	Co (0 h)	24 h	48 h
Rhizome	Men:Lac	0,01±0 <sup>a,#</sup>	0,01±0 <sup>a,#</sup>	0,01±0 <sup>a,#</sup>
	Men:Ac	0,01±0 <sup>a,#</sup>	0,01±0 <sup>a,#</sup>	0,01±0 <sup>a,#</sup>
Leaves	Men:Lac	0,01±0 <sup>a,#</sup>	0,01±0 <sup>a,#</sup>	0,02±0 <sup>a,#</sup>
	Men:Ac	0,01±0 <sup>a,#</sup>	0,01±0 <sup>a,#</sup>	0,01±0 <sup>a,#</sup>
Flowers	Men:Lac	0,01±0 <sup>a,#</sup>	0,01±0 <sup>a,#</sup>	0,01±0 <sup>a,#</sup>
	Men:Ac	0,01±0 <sup>a,#</sup>	0,01±0 <sup>a,#</sup>	0,03±0 <sup>a,#</sup>
DES	Men:Lac	0,01±0 <sup>a,#</sup>	0,01±0 <sup>a,#</sup>	0,05±0 <sup>a,#</sup>
	Men:Ac	0,01±0 <sup>a,#</sup>	0,01±0 <sup>a,#</sup>	0,05±0 <sup>a,#</sup>
CONTROL		0,01 ±0 <sup>a,#</sup>	0,01±0 <sup>a,#</sup>	0,01±0 <sup>a,#</sup>

Co: controle; MI: índice mitótico; TR: tratamento; h: hora. FCC: frequência das mudanças celulares. Análise de variância (ANOVA), médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 0,05. As mesmas letras referem-se a médias de resultados semelhantes entre os tempos de exposição considerados (Co-0h, 24h e 48h) no mesmo tratamento. Letras diferentes referem-se a médias diferentes entre os tempos de exposição considerados (Co-0h, 24h e 48h) dentro do mesmo tratamento. SD: Desvios padrão relatados para cada tempo de análise avaliados para cada concentração. \* Índice mitótico igual ao índice mitótico observado para o controle no mesmo tempo de análise. # Índices de mudanças celulares iguais aos índices de mudanças celulares para o controle para o mesmo tempo de análise.

Com os resultados de não toxicidade para os extratos, há uma indicação de que esses materiais de base biológica podem ser aplicados com segurança em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos destinados ao consumo humano.

#### 4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram selecionados parâmetros de solvente, tempo e temperatura de extração de compostos bioativos presentes na *Curcuma longa* L. (rizoma, folha e flor), sendo determinados como solventes dois DES hidrofóbicos (mentol + ácido láctico e mentol + ácido acético, razão molar 2:1 e 1:1, respectivamente), temperatura de 45 °C e tempos de 2 a 3 horas. Estes extratos apresentaram alta capacidade antioxidante para análises de DPPH, FRAP e flavonoides totais

Algumas análises foram realizadas para verificar as bioatividades dos extratos e dos DES. Foram elas a atividade de quelação do  $Fe^{2+}$ , atividade antimicrobiana, capacidade de inibição das atividades enzimáticas da acetil e butiril colinesterase. Para a análise de quelação do íon de ferro e atividade antibacteriana, destacaram extratos composto por flor e folha, e o DES puro Men:Lac. O Men:Lac e extratos (contendo rizoma, folha ou flor) apresentaram valores de inibição acima de 45% para todas as bactérias testadas, quando comparadas à capacidade antibiótica, e capacidades quelantes de ferro superiores a 50%. Este foi o primeiro estudo que avaliou DES hidrofóbicos quanto as capacidades antibacteriana e quelante de ferro, e que demonstrou valores substanciais. Além disso, os extratos de Men:Lac apresentaram maior potencial inibitório nas atividades enzimática para acetil e butirilcolinesterase (AChE e BChE, respectivamente), quando comparados aos extratos de Men:Ac. Os DES Men:Lac e Men:Ac puros apresentaram o mesmo comportamento. De modo geral, houve maior inibição da atividade enzimática da AChE do que da BChE, em todas as amostras avaliadas.

Também foi verificada e confirmada a não citotoxicidade e genotoxicidade dos DES (mentol + ácido láctico e mentol + ácido acético), dos extratos DES e diferentes partes da *Curcuma longa* L. (rizoma, folha e flor) em células de *A. cepa*. Este pode ser considerado o primeiro indicativo quanto ao uso e aplicação segura dos extratos de partes da *Curcuma longa* L. à base de Men:Lac e Men:Ac (DES hidrofóbicos analisados) em produtos destinados ao consumo e uso humano.

## CAPÍTULO 5 - Efeito do extrato de *Curcuma longa* L. e da curcumina na estrutura e atividade da $\alpha$ -amilase pancreática suína<sup>2</sup>

---

Neste tópico são apresentados os resultados do efeito na atividade da  $\alpha$ -amilase na presença de curcumina, extrato de DES partes da planta *Curcuma longa* L., bem como o estudo das alterações na estrutura da enzima, por meio do emprego das análises de Calorimetria de titulação isotérmica, fluorescência, dicroísmo circular e docking molecular.

### 5.1 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INIBIÇÃO DA $\alpha$ -AMILASE PANCREÁTICA SUÍNA E SALIVAR HUMANA

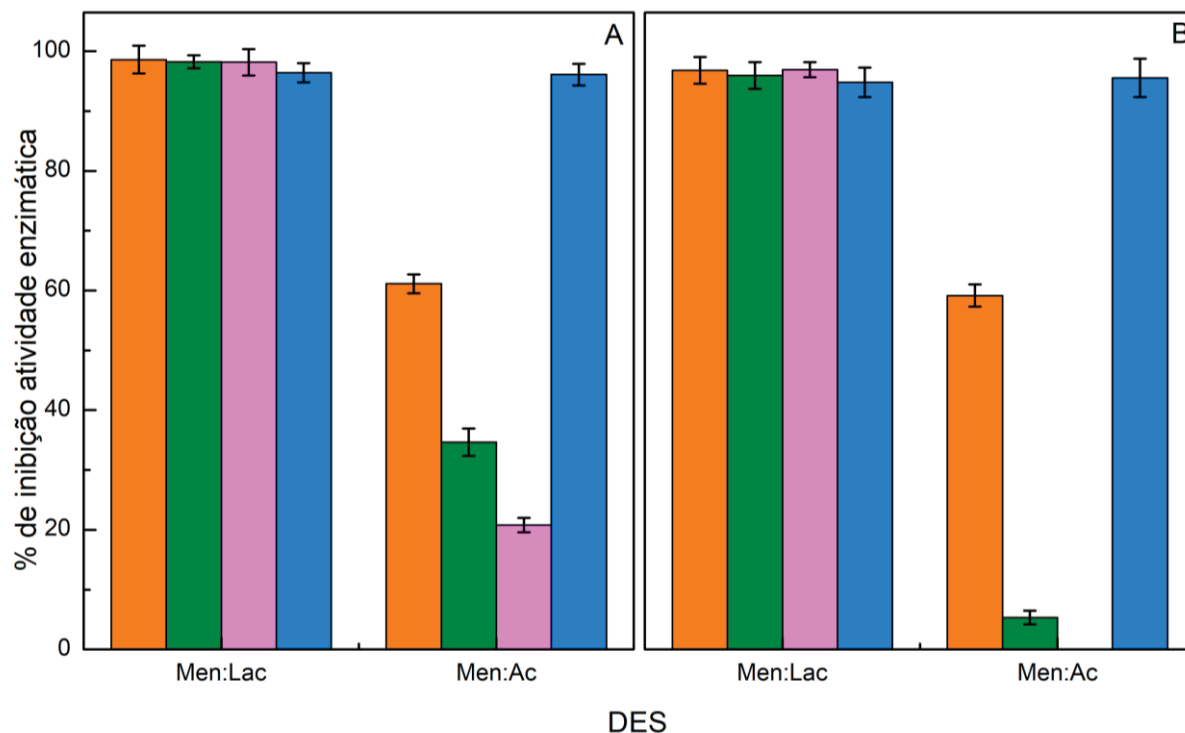
No capítulo anterior, estão descritos a seleção de solventes, temperatura e tempo ideais para a extração de compostos bioativos presentes no rizoma, folha e flor da *Curcuma longa* L.. Conforme descrito, cinco solventes eutéticos profundos (DES) foram testados, sendo três a base de mentol e ácidos láctico, acético e láurico, dois a base de cloreto de colina e os ácidos láctico e acético e o etanol. Os parâmetros foram selecionados através dos resultados das análises de DPPH, FRAP e flavonoides totais. Como solventes, DES à base de mentol + ácido láctico e mentol + ácido acético, Men:Lac e Men:Ac, respectivamente, foram selecionados (OLIVEIRA et al., 2021).

A partir dos extratos e parâmetros selecionados, foram realizadas análises para verificar a atividade biológica dessas amostras. Neste capítulo, são apresentados os resultados das análises de interação entre os extratos selecionados no trabalho anterior, bem como dos solventes puros, com a enzima  $\alpha$ -amilase pancreática suína e salivar humana, conforme mostrado na FIGURA 26.

Na FIGURA 26, é possível observar que todos os extratos com Men:Lac e DES puro proporcionaram inibição acima de 95% na atividade enzimática em ambas as enzimas avaliadas ( $\alpha$ -amilase salivar humana e pancreática suína). Para o Men:Ac é possível perceber uma alta inibição para o DES puro tanto para a  $\alpha$ -amilase salivar humana quanto para a pancreática suína, com redução quando na presença de rizoma, folha e flor, nessa ordem. Para o extrato Men:Ac + Flor, não foi possível observar inibição na atividade da enzima  $\alpha$ -amilase salivar humana.

<sup>2</sup>Os resultados apresentados foram submetidos no Journal: **Food Biophysics**. OLIVEIRA, G.; KASPCHAK, E.; OLIVEIRA, A. LEIMANN, F. V.; PHILIPPSEN, G. S.; SEIXAS, F. A. V.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R. Effect of *curcuma longa* L. extract and curcumin on Porcine Pancreatic  $\alpha$ -Amylase structure and activity.

FIGURA 26 - INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE A):  $\alpha$ -AMILASE PANCREÁTICA SUÍNA E B):  $\alpha$ -AMILASE SALIVAR HUMANA; DOS EXTRATOS DE (■) RIZOMAS; (■) FOLHAS; (■) FLORES DE *CURCUMA LONGA* L. E (■) DES



FONTE: a Autora (2022).

Compostos que inibem a atividade da  $\alpha$ -amilase, para prevenir doenças como diabetes (D'AMICO et al., 2019; KNUDSEN et al., 2019), possuem diversas aplicações em alimentos e fármacos. Observando a alta capacidade de inibição de extratos contendo DES Men:Lac, bem como o solvente puro, (FIGURA 26), foram realizadas análises de fluorescência, dicroísmo circular, calorimetria de titulação isotérmica e docking molecular, com o intuito de se obter um melhor entendimento sobre a interação desses compostos com a enzima. Para essas análises, foi utilizada curcumina e extrato a base de DES Men:Lac e rizoma (Men:Lac extrato) e a enzima  $\alpha$ -amilase pancreática suína.

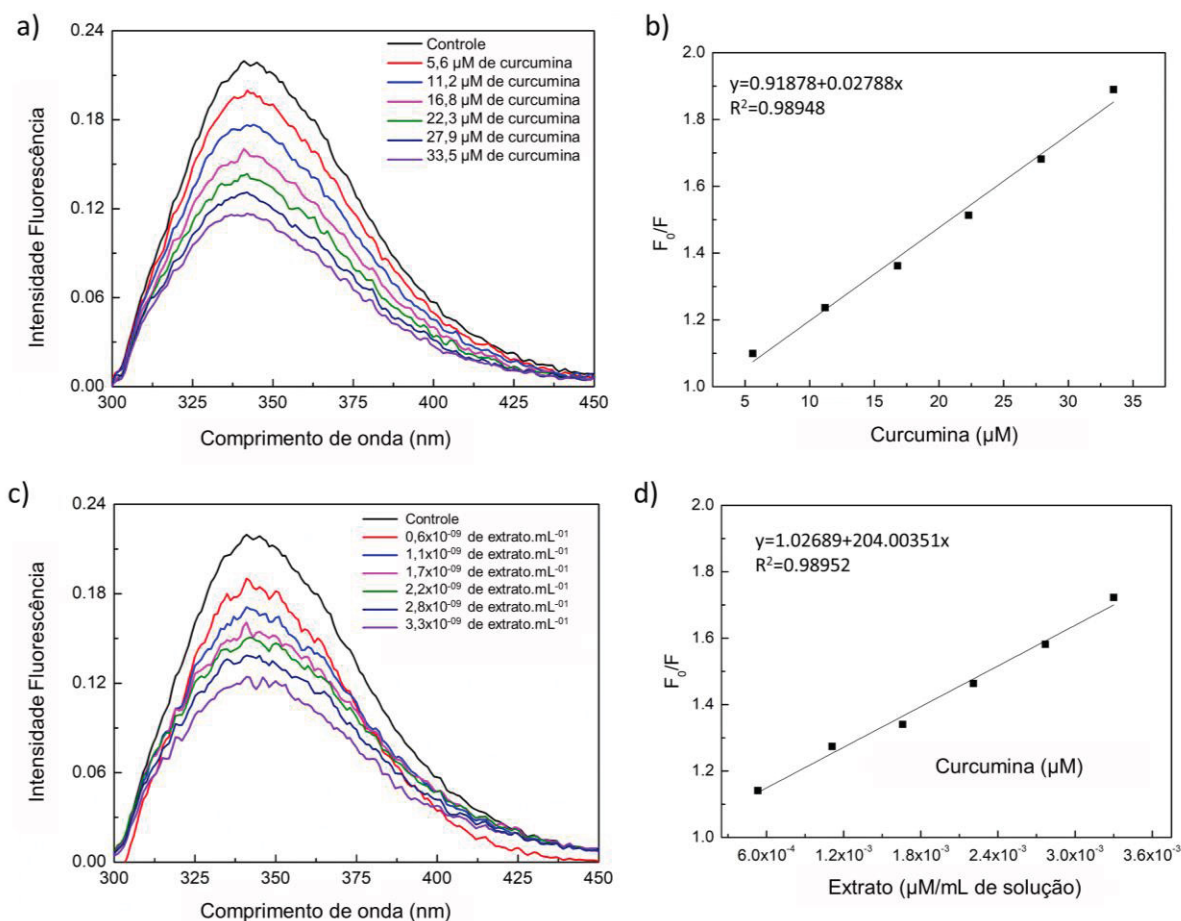
O extrato foi escolhido através de possíveis aplicações em produtos destinados ao consumo humano, visto que os resultados de análises biológicas anteriores mostraram um maior potencial para esta amostra, quando comparada àquelas contendo folhas ou flores de *Curcuma longa* L. (OLIVEIRA et al., 2021). Além disso, Men:Ac possui um cheiro característico de ácido acético, que pode comprometer a aceitação do produto, reduzindo a capacidade de aplicação.

## 5.2 FLUORESCÊNCIA

A técnica de fluorescência é amplamente utilizada para estudar e analisar as interações entre o ligante e proteínas. Mudanças na intensidade da fluorescência podem ocorrer devido a muitos fatores, como reações de estado excitado, rearranjos moleculares, formação de complexos de estado fundamental e devido à transferência de energia (HUANG et al., 1988). A fluorescência foi usada para avaliar os efeitos da curcumina e do extrato de Men:Lac na estrutura da  $\alpha$ -amilase pancreática porcina. Quando a proteína é excitada em 280 nm, ela emite um pico de fluorescência em 331 nm que está relacionado à presença de resíduos de proteína de triptofano. Como mostrado na FIGURA 27a e 27c, as intensidades de fluorescência de  $\alpha$ -amilase exibiram extinção dependente da dose com quantidades crescentes de curcumina e extrato de Men:Lac. À medida que a concentração de curcumina e do extrato Men:Lac aumenta, a intensidade da fluorescência diminui. Isso se deve a mudanças no ambiente na vizinhança da molécula do cromóforo devido à interação da proteína e do ligante diminuindo o sinal de fluorescência no espectro (KAYUKAWA et al., 2019).

As FIGURAS 27b e 27d mostram os gráficos de Stern-Volmer para a curcumina e o extrato Men:Lac, respectivamente. Foi observada uma correlação linear entre a concentração de extinção e a fluorescência máxima observada, indicando um tipo de mecanismo de extinção (PAPADOPOULOU; FRAZIER, 2004). O tempo de vida médio da fluorescência ( $\tau_0$ ) é de aproximadamente  $10^{-9}$  s para  $\alpha$ -amilase e constantes de extinção ( $k_q$ ) superiores a  $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  são atribuídas a um mecanismo estático (CAI et al., 2015). No presente trabalho, o  $k_q$  obtido foi de  $9,39 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  e  $6,87 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , para curcumina e extrato de Men:Lac, respectivamente, apresentando um mecanismo estático de interação. Este tipo de extinção resulta de um complexo de estado fundamental não fluorescente devido à energia insuficiente do extintor para colidir com o fluoróforo no estado excitado (MÁTYUS et al., 2006). Esses resultados mostram que tanto a curcumina quanto o extrato Men: Lac podem interagir com o PPA resultando na diminuição da atividade enzimática descrita no próximo tópico.

FIGURA 27 - ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA REFERENTES A: (A) ESPECTROS DE EMISSÃO NA PRESENÇA DE CURCUMINA (CONCENTRAÇÕES QUE VARIAM DE 5,6  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  ATÉ 33,5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ); (B) GRÁFICO DE STERN-VOLMER DESCREVENDO A EXTINÇÃO CAUSADA PELA CURCUMINA; (C) ESPECTROS DE EMISSÃO OBTIDOS NA PRESENÇA MEN:LAC (CONCENTRAÇÃO DE  $0,6 \times 10^{-9}$  ATÉ  $3,3 \times 10^{-9}$   $\text{L.mL}^{-1}$  DE SOLUÇÃO); (D) GRÁFICO DE STERN-VOLMER DESCREVENDO A EXTINÇÃO NA PRESENÇA DE MEN:LAC EXTRATO. A INTENSIDADE DAS EMISSÕES DE FLUORESCÊNCIA FOI REGISTRADA EM 280 nM, E A EMISSÃO MÁXIMA OCORREU EM 341 nM

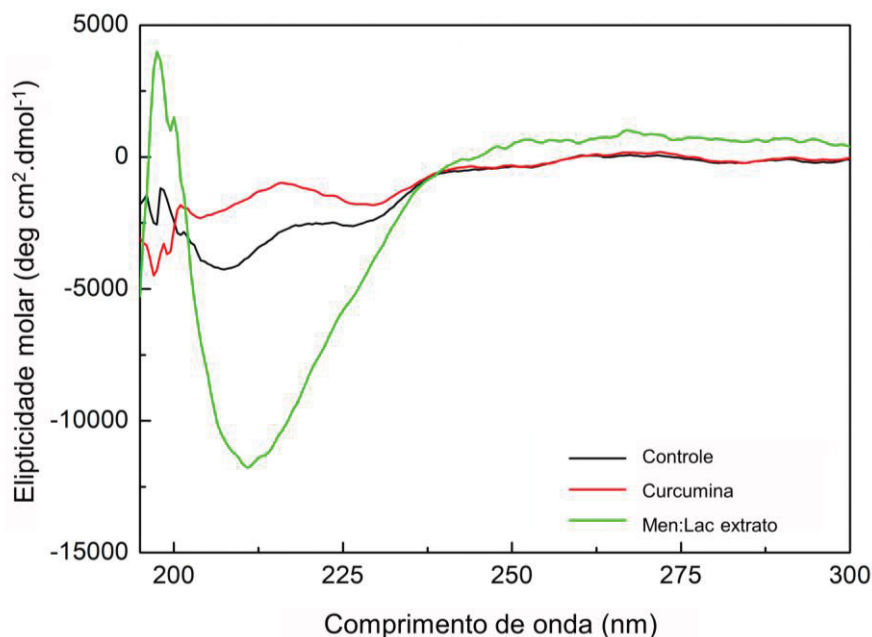


FONTE: a Autora (2022).

### 5.3 DICROÍSMO CIRCULAR (DC)

O dicróismo circular (DC) é um método que auxilia a exploração e a visualização de alterações na estrutura secundária de peptídeos e proteínas devido a presença de diferentes compostos (Zheng et al., 2020). A FIGURA 28 apresenta os espectros de DC para o controle,  $\alpha$ -amilase pura, na presença da curcumina e com extrato Men:Lac.

FIGURA 28 - ESPECTRO UV DO DC DA  $\alpha$ -AMILASE PANCREÁTICA SUÍNA NA PRESENÇA DE 33,5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  DE CURCUMINA E 0,6X10<sup>-3</sup>  $\mu\text{L/mL}$  DE MEN:LAC EXTRATO



FONTE: a Autora (2022).

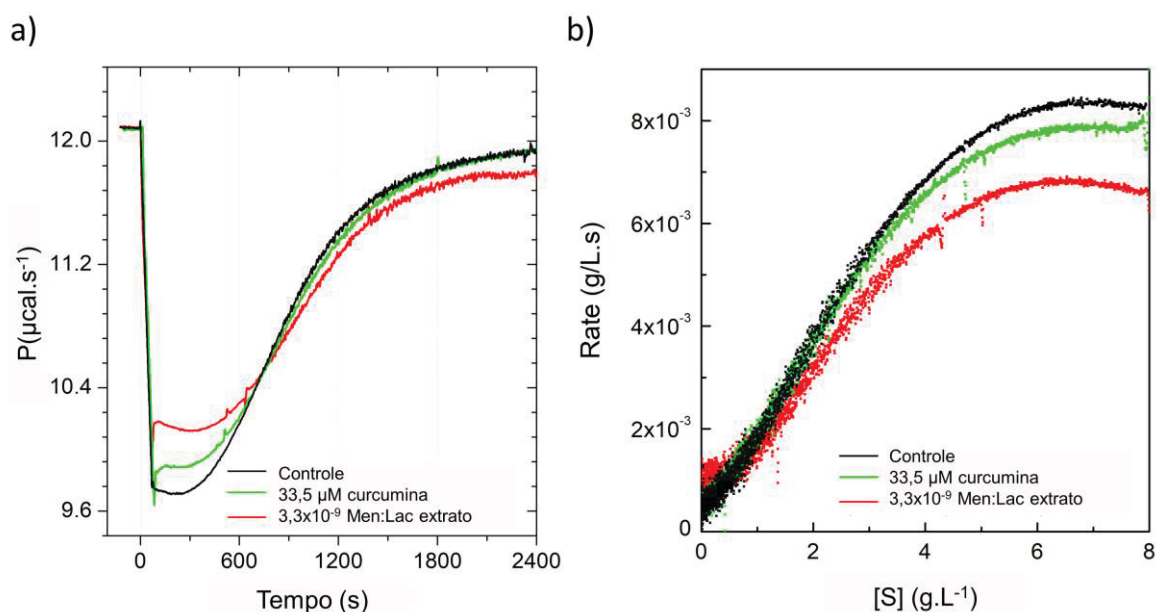
No espectro característico da  $\alpha$ -amilase pancreática suína (curva preta, FIGURA 28) é possível observar duas bandas negativas entre 208 e 225 nm, similar ao relatado por Zheng et al. (2020). Essas bandas são formadas por transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  e  $n \rightarrow \pi^*$  de grupos amida, que são típicas de conformação  $\alpha$ -hélice. Na presença de curcumina (curva vermelha, FIGURA 28) verificou-se um aumento na intensidade dessas bandas negativas. Esse fato pode ser atribuído às interações hidrofóbicas entre a curcumina e a enzima, sendo que o conteúdo de  $\alpha$ -hélice pode aumentar com o aumento da hidrofobicidade do meio (Ding et al., 2018).

No trabalho desenvolvido por Zheng et al. (2020), os autores notaram que, por meio de ligações covalentes entre ácidos fenólicos e a  $\alpha$ -amilase pancreática suína ocorreu um aumento na quantidade das  $\alpha$ -hélices de 4,9% para 6,9%. O aumento da hidrofobicidade está relacionado as ligações de hidrogênio, que alteram a estrutura secundária da  $\alpha$ -amilase e as redes de hidrogênio dificultam a interação entre o sítio catalítico da enzima e o substrato, levando a inativação da  $\alpha$ -amilase (Xu et al., 2019).

#### 5.4 CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA (ITC)

A técnica de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foi utilizada para determinar a cinética enzimática da hidrólise do amido de batata pela  $\alpha$ -amilase. O efeito da curcumina e do extrato (Men:Lac) foi obtido por meio da adição destes compostos na célula de amostra do ITC. A FIGURA 29 (a) mostra o termograma de injeção da  $\alpha$ -amilase pancreática suína na solução de amido de batata (substrato desta enzima). Observou-se que a intensidade do pico diminuiu na presença dos inibidores (curcumina e extrato), indicando uma menor taxa de reação e consequentemente, uma menor conversão do amido em açúcares redutores.

FIGURA 29 - CINÉTICA ENZIMÁTICA DA HIDRÓLISE DO AMIDO PELA AÇÃO DA  $\alpha$ -AMILASE PANCREÁTICA SUÍNA OBTIDA POR CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA. (A) TERMOGRAMA PARA CONVERSÃO DE AMIDO DE BATATA (200  $\mu$ L; 10 mg/mL) APÓS ADIÇÃO DA  $\alpha$ -AMILASE PANCREÁTICA SUÍNA (35  $\mu$ L; 0,010 mg/mL). (B) GRÁFICO DE MICHAELIS-MENTEN CONVERTIDO DO TERMOGRAMA



FONTE: a Autora (2022).

Alguns parâmetros cinéticos da reação enzimática são importantes, como a constante catalítica ( $K_{cat}$ ) e a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), pois auxiliam a compreensão do mecanismo de interação entre enzima e substrato e, o efeito sobre a velocidade da atividade da enzima analisada (Eisenthal et al., 2007). A TABELA 9 apresenta os valores obtidos durante a interação entre  $\alpha$ -amilase e o controle,

curcumina e o extrato, bem como os valores do calor de decomposição do substrato ( $\Delta H$ ).

TABELA 9 - CONSTANTE DE VELOCIDADE CATALÍTICA ( $K_{cat}$ ), CONSTANTE DE MICHAELIS ( $K_M$ ) E CALOR DE DECOMPOSIÇÃO DO SUBSTRATO ( $\Delta H$ ) PARA CONVERSÃO DO AMIDO DE BATATA POR  $\alpha$ -AMILASE SUÍNA OBTIDA POR CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA

PARÂMETRO	CONTROLE	CURCUMINA	Men:Lac EXTRATO
$k_{cat}$ ( $S^{-1}$ )	16,15 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	15,45 $\pm$ 0,07 <sup>ab</sup>	13,65 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>
$k_m$ (mg/mL)	6,83 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	5,93 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	4,80 $\pm$ 0,88 <sup>a</sup>
$\Delta H$ (cal/mg)	-1407,50 $\pm$ 2,12 <sup>a</sup>	-1300 $\pm$ 117,38 <sup>a</sup>	-1392,50 $\pm$ 58,69 <sup>a</sup>

As médias seguidas das mesmas letras não diferem na linha a um nível de confiança de 95%, segundo o teste de Tukey.

Em relação ao  $k_m$ , observa-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos, demonstrando que tanto a curcumina e o extrato atuaram como inibidores competitivos (Rodriguez, Jon-Marc G.; Towns, 2019). Quanto à constante catalítica ( $k_{cat}$ ) os valores obtidos em ordem crescente foram: controle > curcumina > extrato. No entanto, o extrato apresentou o menor valor, diferindo do controle. Como todos os valores de  $\Delta H$  encontrados são negativos (conforme TABELA 9) significa que a entalpia dos reagentes é maior do que a dos produtos, indicando que as reações são exotérmicas e que a maior inibição ocorreu na presença do extrato Men:Lac.

## 5.5 DOCKING MOLECULAR

O docking molecular é um modelo que se baseia em estruturas 3D das moléculas, e pode prever a conformação e a probabilidade da ligação entre uma enzima e os ligantes (Crampon et al., 2021). Neste trabalho, o docking molecular foi empregado com o intuito de melhor analisar as interações entre a enzima  $\alpha$ -amilase pancreática suína e a curcumina e o Men:Lac extrato.

A acarbose é um inibidor das  $\alpha$ -glicosidases, que estão envolvidas na degradação dos dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. A acarbose é um oligossacarídeo modificado que possui um grupo N no lugar do O de uma de suas ligações glicosídicas (PubChem CID:447014). Este oligossacarídeo está presente no trato intestinal, onde exerce suas atividades e, portanto, causa efeitos adversos como flatulência, diarreia e dores abdominais (Fujisawa et al., 2005). No entanto, esse mecanismo é muito eficiente na redução da glicemia, o que torna a inibição das  $\alpha$ -

glicosidases intestinais um alvo interessante para novos anti-hiperglicêmicos (Kato et al., 2017). Assim, justifica-se comparar novos candidatos a inibidores da  $\alpha$ -amilase.

A TABELA 10 resume os escores das simulações de docking dos compostos avaliados, no que diz respeito à acarbose. Nenhum dos compostos investigados neste trabalho apresentou melhor escore relativo em relação à acarbose, o que significa menor probabilidade de ligação à  $\alpha$ -amilase pancreática suína do que a acarbose. Porém, entre eles, a curcumina foi o que obteve o melhor escore relativo e, portanto, a maior probabilidade de se ligar à  $\alpha$ -amilase em relação aos demais. Esse fato não significa que os ligantes avaliados não se liguem à  $\alpha$ -amilase pancreática suína; na verdade, indica apenas uma baixa probabilidade de os compostos se ligarem à enzima alvo e, portanto, a necessidade de concentrações mais elevadas para se ligarem e inibirem a atividade enzimática.

TABELA 10 - PONTUAÇÕES MÉDIAS PARA COMPOSTOS AVALIADOS NAS SIMULAÇÕES DE DOCKING CONSIDERANDO A  $\alpha$ -AMILASE PANCREÁTICA SUÍNA COMO O ALVO

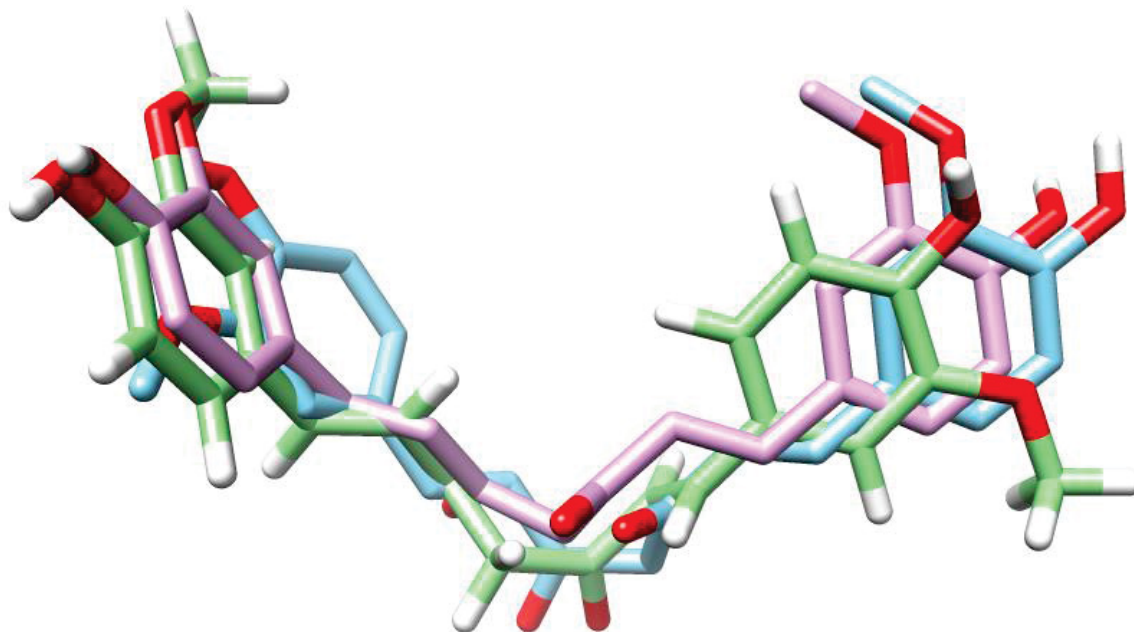
COMPOSTOS	AUTODOCK SCORE	MOLEGRO SCORE	VINA SCORE	SCORE RELATIVO
Acarbose pentasacarídeo	-5,96 $\pm$ 0,40	-177,44 $\pm$ 6,86	-9,0 $\pm$ 0,0	0,917
Curcumina (CID 969516)	-7,93 $\pm$ 0,15	-119,95 $\pm$ 0,62	-8,3 $\pm$ 0,1	0,867
Mentol (CID 1254)	-5,33 $\pm$ 0,00	-54,07 $\pm$ 0,05	-5,9 $\pm$ 0,0	0,544
Ácido Láctico (CID 612)	-1,96 $\pm$ 0,03	-45,22 $\pm$ 0,07	-3,4 $\pm$ 0,1	0,293

A FIGURA 30 mostra as melhores poses de curcumina encontradas pelo programa Molegro a partir de três simulações, indicando um padrão de encaixe. Já a FIGURA 31, mostra as interações que a curcumina faz com resíduos do sítio ativo da  $\alpha$ -amilase pancreática suína. Por outro lado, na FIGURA 32, pode ser encontrado o conjunto de poses sobrepostas do mentol e do ácido láctico encontradas com o programa Molegro. O mentol e o ácido láctico, foram testados uma vez que foram os compostos utilizados no preparo do DES Men:Lac.

O fato de o programa ter encontrado várias poses idênticas, o que pode ser visto pela sobreposição quase perfeita, também sugere um padrão de vinculação. No entanto, devido ao seu tamanho menor em comparação com os ligantes  $\alpha$ -amilase canônicos, como amido ou acarbose, esses dois ligantes podem ser posicionados em

outro lugar no sítio ativo quando avaliados por outro programa, o que não é um comportamento típico de um ligante verdadeiro.

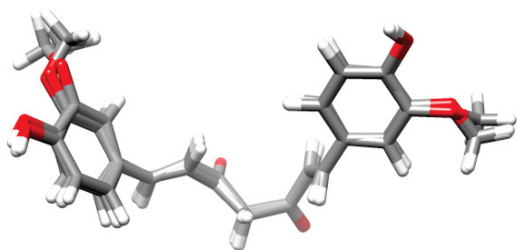
FIGURA 30 - POSE DE CURCUMINA ANCORADA NO SÍTIO ATIVO DA  $\alpha$ -AMILASE PANCREÁTICA SUÍNA OBTIDA EM AUTODOCK (AZUL), MOLEGRO (VERDE) E VINA (ROXO).



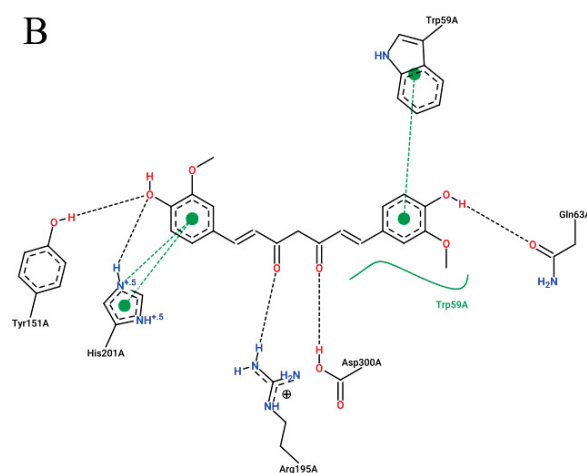
FONTE: a Autora (2022).

FIGURA 31 - A CURCUMINA ANCORADA NO SÍTIO ATIVO DA  $\alpha$ -AMILASE PANCREÁTICA SUÍNA. (A) CONJUNTO DE POSES OBTIDO NO PROGRAMA MOLEGRO E (B) O RESPECTIVO DIAGRAMA DE INTERAÇÃO 2D GERADO NO PROGRAMA POSEVIEW (STIERAND et al., 2006).

A

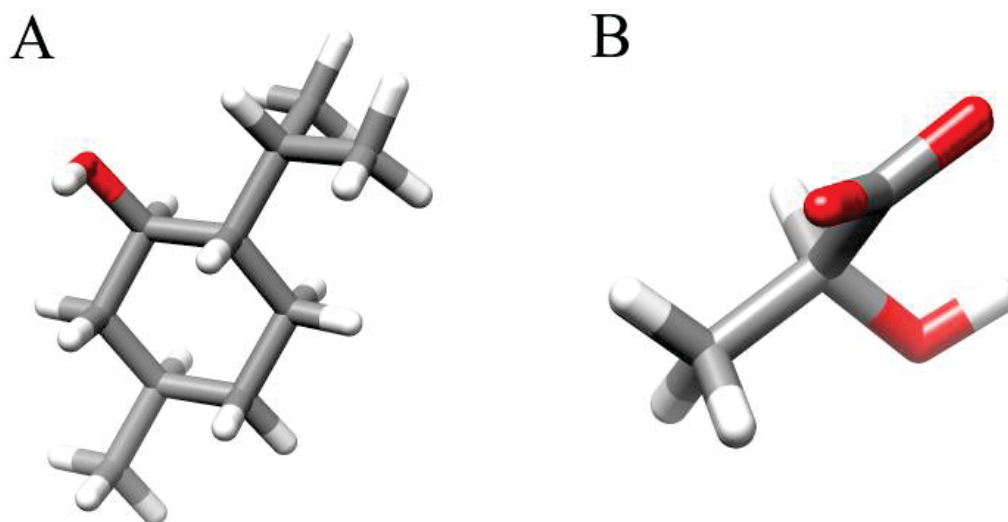


B



FONTE: a Autora (2022).

FIGURA 32 - CONJUNTO DE POSES COM MELHORES PONTUAÇÕES OBTIDAS NO PROGRAMA MOLEGRO PARA: (A) MENTOL E (B) ÁCIDO LÁCTICO



FONTE: a Autora (2022).

Embora as simulações de docking não possam ser interpretadas como evidências empíricas, elas indicam um possível mecanismo de ligação e destacam os ligantes com maior probabilidade de se ligar a partir de uma determinada biblioteca. Nesse sentido, os resultados obtidos por docking estão de acordo com os resultados observados pelos ensaios de inibição enzimática, onde a curcumina foi o ligante com maior capacidade de inibição.

## 5.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, a atividade das enzimas  $\alpha$ -amilase salivar humana e pancreática suína na presença de dois solventes eutécticos profundos (DES do *inglês deep eutectic solvents*) (Men:Lac e Men:Ac) e extratos de rizoma, folha e flor de *Curcuma longa* L., foi avaliada. Ambos os DES inibiram mais de 95% da atividade dessas enzimas, os extratos com as partes da planta extraídas com o Men:Lac, no geral aumentaram a capacidade de inibição, de ambas as enzimas, quando comparado a capacidade do DES puro. Já os extratos com o Men:Ac, causou redução da inibição da atividade das  $\alpha$ -amilases.

O efeito da curcumina e do extrato Men:Lac de rizoma na atividade e estrutura da  $\alpha$ -amilase pancreática suína, foi estudado por meio das técnicas de fluorescência, dicroísmo circular (DC), calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e docking molecular. O fato de a curcumina e o extrato Men:Lac apresentarem alta inibição da atividade da

$\alpha$ -amilase, está relacionado à presença da curcumina que pode interagir com a enzima através de um mecanismo estático, conforme observado por espectroscopia de fluorescência, e modificação da estrutura secundária da proteína.

Por meio da análise do ITC, foi possível observar que na presença da curcumina e do extrato Men:Lac, houve uma menor taxa de reação, relacionada à inibição da atividade enzimática. A inibição provavelmente ocorre por inibição não competitiva, uma vez que nenhuma diferença significativa foi obtida para a constante de Michalis-Menten. O docking molecular mostrou que a curcumina é o composto com maior probabilidade de se ligar ao sítio ativo da  $\alpha$ -amilase pancreática suína em comparação com o mentol e o ácido láctico, compostos utilizados no preparo do DES. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que os extratos de curcumina e *Curcuma longa* L. obtidos por extração empregando os DES, têm grande potencial para serem utilizados como inibidores da  $\alpha$ -amilase, podendo ser considerados uma alternativa para as indústrias de fármacos e alimentos.

## CAPÍTULO 6 – Determinação da solubilidade de biomoléculas em meio aquoso usando DES e emprego de modelos tipo COSMO<sup>3</sup>

---

*Neste tópico está apresentado os dados de solubilidade da quercetina, curcumina e ácido gálico em meio aquoso, composto por DES ([Ch]Cl + xilitol (2:1)) + 10% água (m/m), [Ch]Cl, xilitol e [Ch]Cl + xilitol e uma abordagem preditiva baseada em modelos tipo COSMO.*

### 6.1 SOLUBILIDADE DA QUERCETINA, CURCUMINA E DO ÁCIDO GÁLICO

Os dados de solubilidade são essenciais tanto para os processos de separação quanto para o processamento de biomoléculas de interesse industrial. Diversas biomoléculas são aplicadas em larga escala, nas mais diversas indústrias, sendo necessário e requerida alta pureza. A quercetina (ANDRES et al., 2017), curcumina (MAHESHWARI et al., 2006; AK; GÜLÇİN, 2008) e o ácido gálico (PASANPHAN et al., 2008), por exemplo, são moléculas comumente empregadas nas indústrias química, alimentícia e farmacêutica por apresentarem alta atividade antioxidante e possuírem diversos potenciais de aplicações tecnológicas (YOON et al., 2017; GHAYOUR et al., 2019).

Assim, nesta etapa do trabalho foram determinadas as solubilidades das seguintes biomoléculas: quercetina, curcumina e ácido gálico; em água pura e combinações de água + aditivos, sendo os aditivos avaliados: DES; Mistura simples de [Ch]Cl + xilitol; [Ch]Cl; e xilitol.

Na TABELA 11, estão apresentados os valores de solubilidade obtidos para todos os sistemas. Nas FIGURAS 27-29 são apresentados os dados de solubilidade em termos do logaritmo natural da razão de solubilidade das misturas e em água pura ( $\ln S/S_0$ ), tendo que  $S$  é a solubilidade em água + aditivo e  $S_0$  é a solubilidade em água pura.

Para quercetina, FIGURA 33, é possível notar um aumento significativo da solubilidade com o aumento do teor de todos os aditivos. Como se sabe, a quercetina é uma biomolécula hidrofóbica, ( $\text{Log } K_{OW} = 1,46$ ) (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), sendo assim, pouco solúvel em água ( $S_0 = 0,0048 \text{ g.L}^{-1}$ ). Foi possível perceber que em concentrações de aditivo abaixo de 40% (m/m), houve uma menor dependência

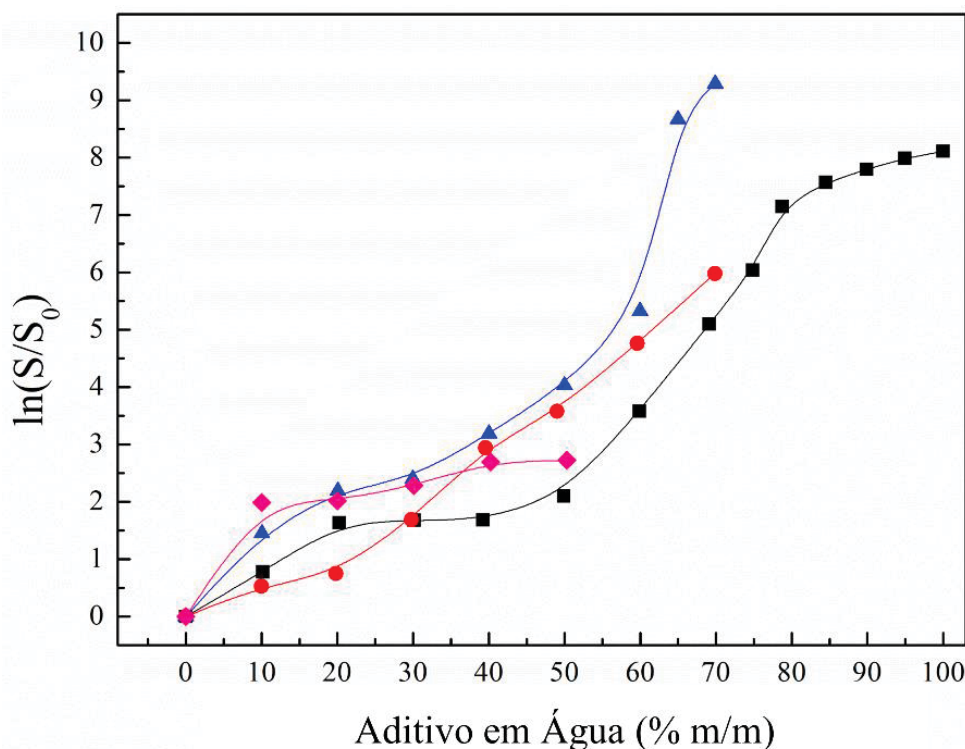
<sup>3</sup>Os resultados apresentados foram publicados no seguinte trabalho: OLIVEIRA, G.; WOJECCHOWSKI, J. P.; FARIAS, F. O.; IGARASHI-MAFRA, L.; SOARES, R. D. P.; MAFRA, M. R. Enhancement of biomolecules solubility in aqueous media using designer solvents as additives: an experimental and COSMO-based models' approach. **Journal of Molecular Liquids**. v. 318, 2020.

entre o aumento da solubilidade e a presença de aditivo. Quando as concentrações de aditivos são superiores a 50% em massa, a diferença na capacidade dos aditivos de aumentar a solubilidade da quercetina foi observada na seguinte ordem: [Ch]Cl > [Ch]Cl + xilitol > DES > xilitol.

Empregando cloreto de colina como aditivo, até o limite de 70% m/m, é possível observar um aumento na solubilidade da quercetina em relação a água pura de aproximadamente 10000 vezes, como pode ser observado na TABELA 11.

Este fato sugere que mesmo quando a mistura de DES ou [Ch]Cl + xilitol foi aplicada, o [Ch]Cl tem um efeito predominante na solubilidade da quercetina.

FIGURA 33 - SOLUBILIDADE ( $\ln(S/S_0)$ ) DA QUERCETINA EM SOLUÇÃO AQUOSA DE: (■) DES; (●) [Ch]Cl + XILITOL; (▲) [Ch]Cl E (◆) XILITOL. AS LINHAS TRACEJADAS FORAM OBTIDAS PELO SPLINE



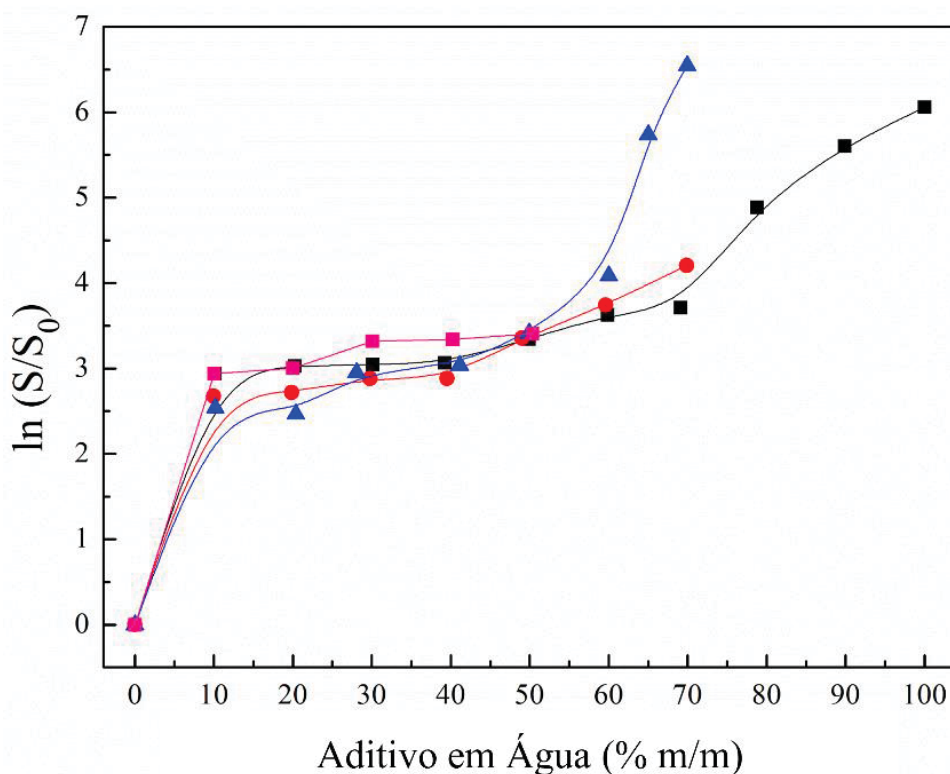
FONTE: a Autora (2022).

A curcumina apresenta uma menor solubilidade em água quando comparada com a quercetina ( $\log K_{OW} = 3,29$  e  $S_0 = 0,0014 \text{ g.L}^{-1}$ ). Foi possível observar um aumento na solubilidade com o aumento da concentração do aditivo (FIGURA 34), mesmo comportamento encontrado para a quercetina. Quando as concentrações dos aditivos foram superiores a 60% (m/m), as diferenças entre eles nos valores de solubilidade foram observadas. A capacidade de cada aditivo para aumentar a

solubilidade da curcumina foi a mesma encontrada para a quercetina, seguindo a ordem: [Ch]Cl > [Ch]Cl + xilitol > DES > xilitol. Quando [Ch]Cl esteve na concentração de 70%, a solubilidade aumentou até 700 vezes a da água (TABELA 11).

Abaixo de 60%, todos os aditivos apresentaram valores próximos para a solubilidade da curcumina, como pode ser visto na FIGURA 34. Este fato, reforça a hipótese que dentre os aditivos testados o [Ch]Cl é o composto que mais influencia a solubilidade, sendo o principal responsável pelo aumento da solubilidade das duas biomoléculas hidrofóbicas avaliadas (curcumina e quercetina).

FIGURA 34 - SOLUBILIDADE ( $\ln S/S_0$ ) DA CURCUMINA EM SOLUÇÃO AQUOSA DE: (■) DES; (●) [Ch]Cl + XILITOL; (▲) [Ch]Cl E (◆) XILITOL. AS LINHAS TRACEJADAS FORAM OBTIDAS PELO SPLINE

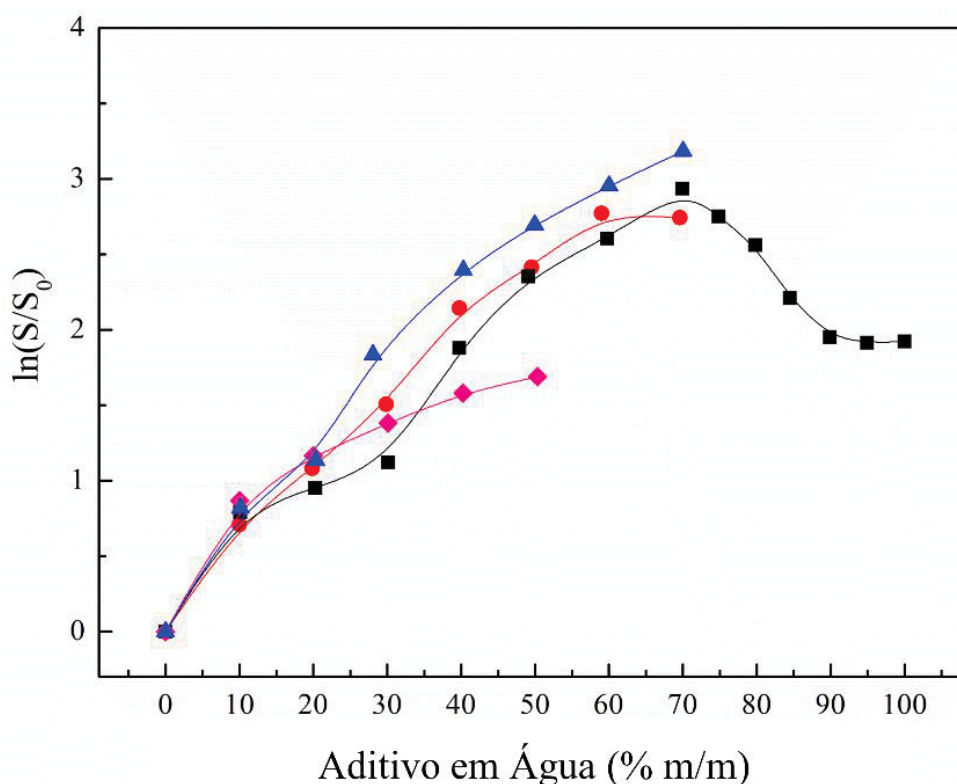


FONTE: a Autora (2022).

A solubilidade do ácido gálico, biomolécula menos hidrofóbica ( $\log K_{OW} = 0,7$ ,  $S_0 = 6,62 \text{ g.L}^{-1}$ ), também foi avaliada conforme mostrado na FIGURA 35. Estes dados serviram de comparação com os resultados da solubilidade das outras duas biomoléculas, uma vez que o ácido gálico é significativamente mais hidrofílico do que a quercetina e a curcumina. Conforme anteriormente observado, a aplicação do [Ch]Cl como aditivo na água resultou em um aumento da solubilidade da biomolécula e na concentração de 70%, houve aumento de até 24 vezes, conforme TABELA 11.

Outros compostos estudados geraram aumento na solubilidade do ácido gálico em meio aquoso, como os líquidos iônicos (IL do inglês - *ionic liquids*) (CLÁUDIO et al., 2015) e éteres de glicerol (SANGHVI; EVANS; YALKOWSKY, 2007), com aumento de 40 e 22 vezes, respectivamente.

FIGURA 35 - SOLUBILIDADE ( $\ln(S/S_0)$ ) DO ÁCIDO GÁLICO EM SOLUÇÃO AQUOSA DE: (■) DES; (●) [Ch]Cl + XILITOL; (▲) [Ch]Cl E (◆) XILITOL. AS LINHAS TRACEJADAS FORAM OBTIDAS PELO SPLINE



FONTE: a Autora (2022).

O efeito hidrótrópico nos sistemas contendo DES ou mistura de [Ch]Cl + Xilitol como aditivos pode ser observado na FIGURA 35, curvas preta e vermelha. Na prática, o efeito hidrótrópico apresenta um aumento da solubilidade seguido de redução, ou seja, esse parâmetro está diretamente relacionado com a concentração de aditivo no sistema. O conceito e entendimento do efeito hidrótrópico ainda é bastante complexo. Alguns estudos sugerem que por meio das interações de atração dipolo-dipolo ou van der Waals, a água ora faz preferência da ligação com o aditivo ora com a biomolécula, que neste caso, ocorreria entre o anel aromático do ácido gálico entre a água e o aditivo (SANGHVI et al., 2007; CLÁUDIO et al., 2015).

Porém, quando o efeito hidrótopo é observado para líquidos iônicos (CLÁUDIO et al., 2015) e solventes eutéticos profundos, conforme relatado neste trabalho, esta teoria não é suficiente para explicar este fenômeno e concordar com outros autores que descartaram as interações  $\pi$ - $\pi$  como a causa principal da hidrotropia (SRINIVAS et al., 1997; MANSUR; 1999; SANGHVI et al., 2007; CLÁUDIO et al., 2015). Segundo Soares (2020), cátions não aromáticos, como é o caso do cloreto de colina, podem induzir o efeito hidrótopo, conforme observado neste trabalho.

No que diz respeito aos processos industriais de separação e purificação de biomoléculas, o efeito hidrótopo possui grande relevância. Uma vez que, é possível propor métodos simples para solubilizar e na sequência precipitar o composto usando água como antissolvente, por exemplo.

A constante de Setschenow ( $K_H$ ), é utilizada para auxiliar e identificar a mudança na solubilidade de um soluto devido à presença de um hidrótopo (SETSCHENOW, 1989). Esta constante é obtida conforme descrito na Equação (12) e auxilia na melhor compreensão do fenômeno hidrótopo de um soluto (SETSCHENOW, 1989). A constante de Setschenow é considerada uma forma simples de descrever o efeito hidrótopo de um aditivo em um determinado solvente, podendo prever as regiões de maior e menor solubilidade do soluto. Neste trabalho, a equação foi aplicada para auxiliar no entendimento e descrever o efeito hidrotópico nas soluções aquosas estudadas (CLÁUDIO et al., 2015; SOARES et al., 2020).

$$\ln\left(\frac{S}{S_0}\right) = K_H \cdot C_H \quad (12)$$

Sendo:  $S$  a solubilidade molar do soluto;  $S_0$  a solubilidade do soluto em água;  $K_H$  é a constante de Setschenow e  $C_H$  é a molaridade do hidrótopo.

Sabe-se que a constante de Setschenow está relacionada à preferência do soluto em interagir com o hidrótopo ao invés da água, portanto, quanto maior esse valor, maior a solubilidade do soluto (SOARES et al., 2020). As constantes de Setschenow encontradas para sistemas com ácido gálico e soluções aquosas seguiram a seguinte ordem: [Ch]Cl > DES  $\approx$  [Ch]Cl + xilitol > xilitol, com valores de 0,67, 0,62, 0,62 e 0,44, respectivamente. Consequentemente, como esperado, as maiores solubilidades do ácido gálico seguiram esta ordem, como pode ser visto na FIGURA 35.

TABELA 11 - SOLUBILIDADE (S, g.L<sup>-1</sup>) DA QUERCETINA, CURCUMINA E ÁCIDO GÁLICO EM SOLUÇÕES DE ÁGUA + ADITIVOS A 298,2 K E PRESSÃO ATMOSFÉRICA (91 kPa)<sup>1</sup>

[Ch]Cl (% m/m)	S (g/L)	Xylitol (% m/m)	S (g/L)	DES (% m/m)	S (g/L)	[Ch]Cl + xylitol (% m/m)	S (g/L)
<b>Quercetina</b>							
0,000	0,005	10,02	0,035	10,14	0,010	9,97	0,008
10,05	0,021	20,02	0,036	20,25	0,024	19,84	0,010
20,06	0,043	30,10	0,047	30,15	0,025	29,79	0,026
29,96	0,053	40,24	0,071	39,22	0,025	39,55	0,091
40,02	0,117	50,33	0,073	49,90	0,039	49,02	0,172
50,02	0,271			59,87	0,172	59,64	0,563
59,99	0,986			69,11	0,785	69,88	1,897
65,00	27,91			74,88	2,011		
69,92	51,98			78,76	6,101		
				84,49	9,279		
				89,88	11,67		
				94,93	14,14		
				100,0	16,12		
<b>Curcumina</b>							
0,000	0,001	10,02	0,027	10,14	0,026	9,97	0,020
10,19	0,018	20,02	0,028	20,25	0,028	19,84	0,021
20,40	0,017	30,10	0,039	30,15	0,029	29,79	0,025
28,07	0,027	40,24	0,040	39,22	0,030	39,55	0,025
41,15	0,029	50,33	0,042	49,90	0,040	49,02	0,044
49,94	0,043			59,87	0,053	59,64	0,059
60,03	0,083			69,11	0,057	69,88	0,094
65,00	0,434			78,76	0,185		
69,96	0,976			89,88	0,385		
				100,0	0,598		
<b>Ácido Gálico</b>							
0,000	6,617	10,02	15,76	10,14	14,61	9,97	13,44
10,12	15,02	20,02	21,21	20,25	17,13	19,84	19,48
20,37	20,53	30,10	26,33	30,15	20,29	29,84	29,81
28,07	41,46	40,24	32,14	39,75	43,34	39,79	56,45
40,29	72,71	50,33	35,83	49,08	69,66	49,55	74,08
49,94	98,06			59,81	89,56	59,02	105,8
60,03	127,1			69,94	124,5	69,64	102,7
70,02	159,6			74,88	103,8		
				79,78	85,63		
				84,49	60,41		
				89,92	46,64		
				94,93	44,84		
				100,0	45,23		

<sup>1</sup>As incertezas (u) são:  $u(P) = 10 \text{ kPa}$ ;  $u(T) = 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $u(\%) = 0,01\%$  e  $u(S) = 0,006\text{g/L}$ .

Para todas as biomoléculas avaliadas foi possível observar diferentes comportamentos quando utilizados os DES e as misturas [Ch]Cl + xilitol. Esse efeito cria a hipótese de que as ligações de hidrogênio do DES têm um papel essencial acima no comportamento da solubilidade, como será discutido a seguir.

## 6.2 LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO NO DES

Algumas diferenças são observadas entre as misturas de DES e [Ch]Cl + xilitol nas solubilidades de biomoléculas, conforme demonstrado nas FIGURAS 33, 34 e 35, embora ambos os aditivos apresentem a mesma composição teórica, tendo diferença apenas no preparo das soluções. As curvas referentes a esses aditivos para cada biomolécula são mostradas na FIGURA 37.

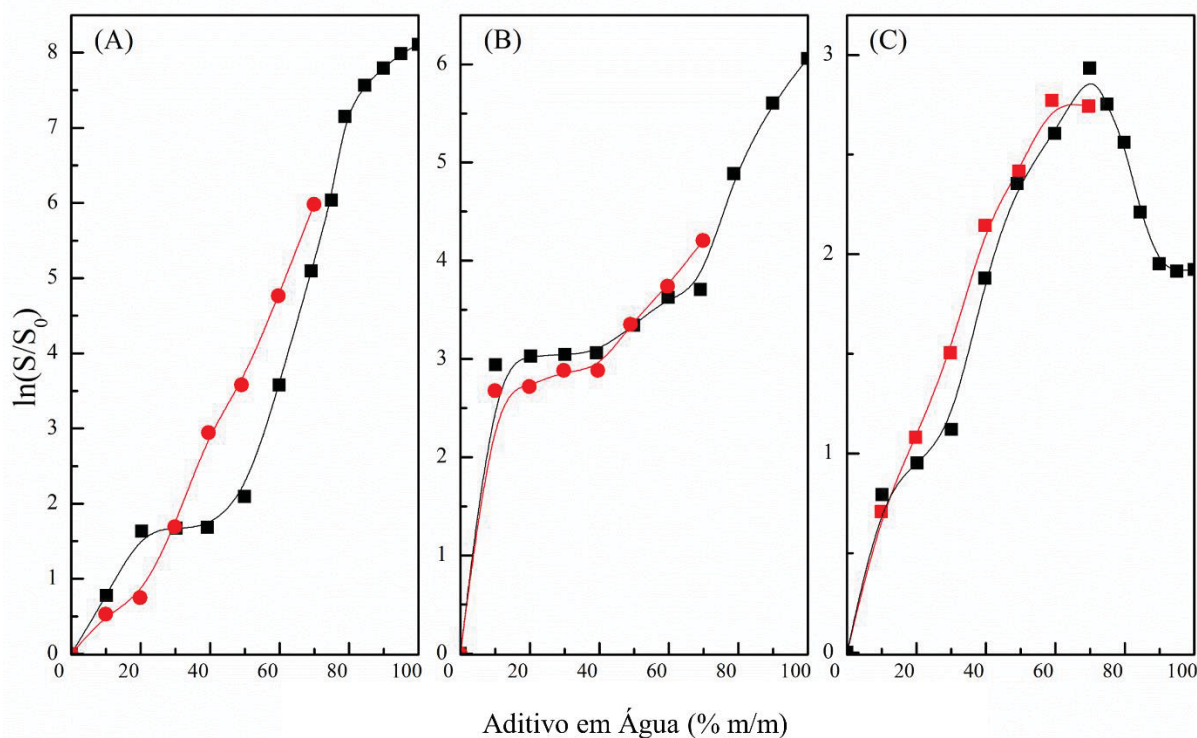
Vale ressaltar, a importância da obtenção do DES e seu preparo adequado. Como bem estabelecido, o DES resulta de complexos de ligações de hidrogênio entre HBA e HBD (MARTINS; PINHO; COUTINHO, 2018). Em alguns casos, os compostos formadores dos DES (HBA e HBD) são sólidos à temperatura ambiente, como é o caso do [Ch]Cl e do xilitol. Após o preparo do DES, devido as ligações de hidrogênio, obtém-se um solvente líquido, transparente e homogêneo (DAI et al., 2013) mesmo em temperatura ambiente.

Antes da avaliação da solubilidade da biomolécula na solução de [Ch]Cl e xilitol, foi necessário realizar a solubilização de ambos os compostos para obter uma solução homogênea, exigindo pelo menos 30% em peso de água. Como no preparo do DES ocorre a solubilização dos compostos com um teor de água de 10%, este fato pode indicar a formação das ligações de hidrogênio, característica do DES. Se as ligações de hidrogênio formadas durante o preparo do DES não interferissem na solubilização das biomoléculas, uma sobreposição das curvas seria observada, o que não ocorre, como pode ser observado na FIGURA 36.

Além disso, a água pode atuar como HBA e HBD, possibilitando fortes interações com os constituintes do DES. Neste trabalho, 10% de água foi aplicada no preparo DES (KROON et al., 2013; FOURMENTIN; GREIGE-GERGES, 2019). Sabe-se que a adição de água ao DES altera suas características físico-químicas, como redução da viscosidade, o que favorece a transferência de massa na extração sólido-líquido, aumentando a eficiência de extração e alterando da polaridade do solvente.

Entretanto, a adição de água pode levar a um enfraquecimento significativo das interações entre os componentes do DES (DAI et al., 2015).

FIGURA 36 - SOLUBILIDADE ( $\ln(S/S_0)$ ) DE: (A) QUERCETINA, (B) CURCUMINA E (C) ÁCIDO GÁLICO EM UMA SOLUÇÃO AQUOSA DE (■) DES E (●) [Ch]Cl + XILITOL. AS LINHAS FORAM OBTIDAS PELO SPLINE



FONTE: a Autora (2022).

Estudos abordaram a interação DES e água, compilando os resultados de alguns trabalhos da literatura (ZHEKENOV et al., 2017; VILKOVÁ et al., 2020; HAMMOND et al., 2020) e, perceberam que a água pode fazer parte de um complexo supramolecular com DES. No entanto, essas pesquisas relatam que dependendo da concentração de água (específica para cada DES), este complexo pode se desintegrar, ocorrendo apenas a formação de uma solução aquosa constituída pelos seus componentes individuais.

Em baixas concentrações de água, abaixo de 20%, somente o DES pode ser obtido, ou seja, na mistura dos compostos ocorre precipitação. Na FIGURA 28, pode ser observado que concentrações a partir de 20% de água, tanto no DES quanto na mistura ([Ch]Cl + xilitol), tendem a gerar uma aproximação na solubilidade das

biomoléculas. Fato que poderia ser observado se houvesse a possibilidade de avaliação em concentrações igual ou abaixo de 20% de água para a mistura.

### 6.3 EMPREGO DO MODELO COSMO

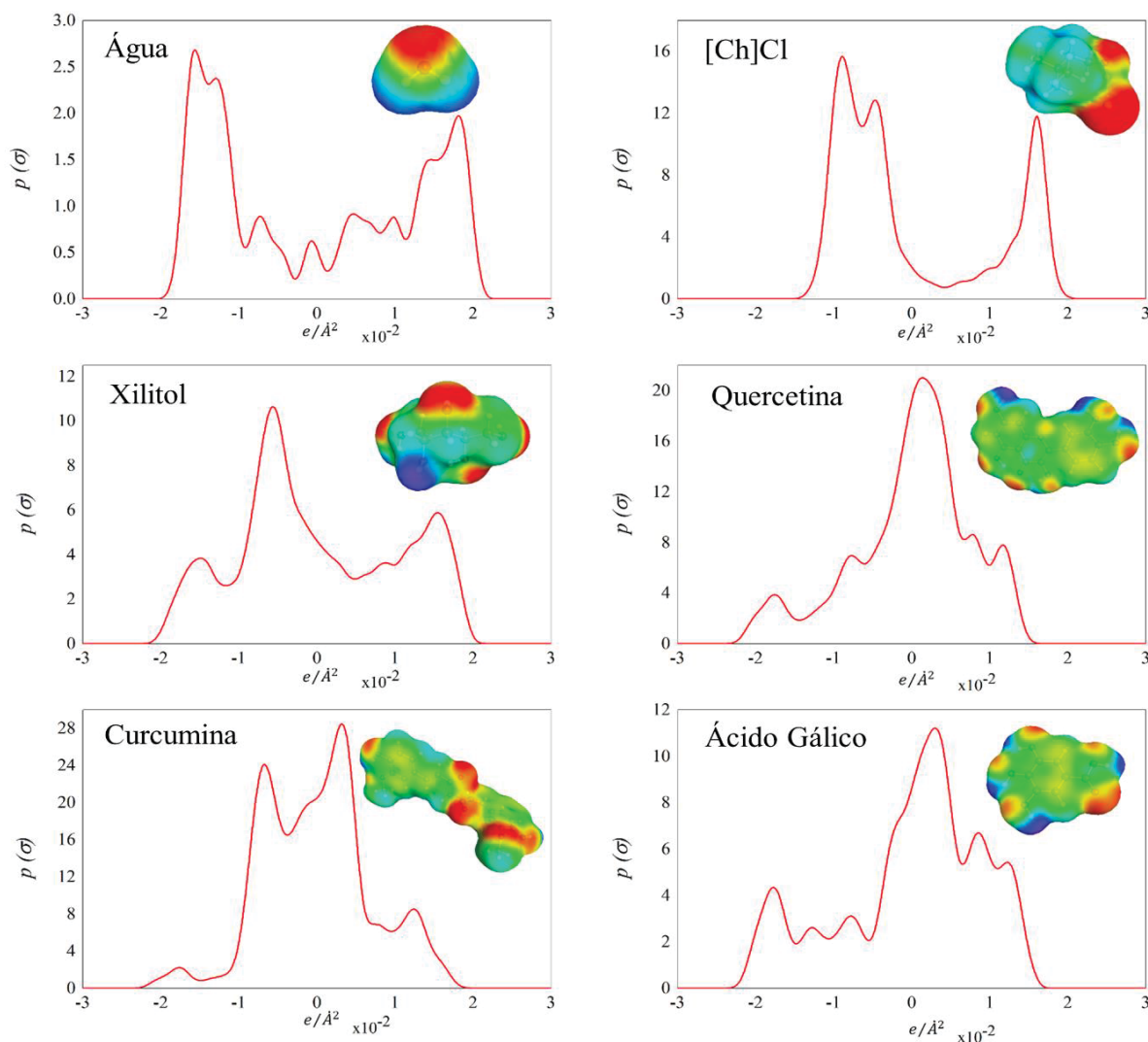
#### 6.3.1 Perfis Sigma

Os perfis sigmas das biomoléculas estão apresentados na FIGURA 37, os quais auxiliam na verificação da distribuição de carga nas moléculas, explicando diferenças de polaridade, por exemplo. Usualmente, o perfil  $\sigma$  de uma molécula é mostrado na faixa entre  $\pm 0,02 e/\text{Å}^2$ . Valores menores que  $-0,01 e/\text{Å}^2$  são considerados dentro da região receptora da ligação de hidrogênio. Da mesma forma, valores maiores de  $+0,01 e/\text{Å}^2$  se referem à área doadora da ligação de hidrogênio.

Quanto maior for a área do perfil sigma na faixa entre  $+ 0,01e/\text{Å}^2$  e  $- 0,01e/\text{Å}^2$ , maior é a região apolar de uma molécula. Há uma inversão no sinal da densidade da carga de polarização  $\sigma$ , ou seja, cargas negativas induzem cargas positivas que são demonstradas no perfil  $\sigma$  e o mesmo vale para o contrário, cargas positivas induzem cargas negativas. No perfil  $\sigma$  da molécula da água pode ser observado que o pico negativo do oxigênio está representado no lado direito do gráfico e o pico dos dois hidrogênios estão representados no lado esquerdo (ECKERT; KLAMT, 2002). Cada cor na representação 3D das moléculas refere-se às cavidades do COSMO. O azul indica a polarização negativa (parte positiva da molécula), o verde as partes neutras e o vermelho a polarização positiva (parte negativa da molécula) (KLAMT; ECKERT; ARLT, 2010).

Pode ser observado no perfil sigma do cloreto de colina que há uma parte que atua como receptor das ligações hidrogênio e para o xilitol, uma região que atua como doadora de hidrogênio. Este fato auxilia no entendimento da formação do DES utilizando estes dois compostos

FIGURA 37 - PERFIS  $\sigma$  E DENSIDADES DE CARGA SUPERFICIAL INDUZIDA EM 3D OBTIDOS DO COSMO-RS DAS MOLÉCULAS INVESTIGADAS NESTE TRABALHO.



FONTE: a Autora (2022).

Com relação as biomoléculas (quercetina, curcumina e ácido gálico), ao compararmos seus perfis  $\sigma$  com o da água, pode ser notado que o ácido gálico possui uma região  $\sigma$  negativamente forte, resultado dos seus quatro hidrogênios polares. Para a quercetina e a curcumina, podem ser ressaltadas algumas diferenças significativas. Ambas as moléculas possuem superfícies apolares, sendo representadas pelas cores azul-esverdeadas referentes as moléculas de hidrogênio e amarelo-esverdeado nas regiões dos carbonos, conforme mostra a FIGURA 37. Como já descrito, o valor do  $\log K_{ow}$  da curcumina é maior que o da quercetina, fato que corrobora com a maior superfície da curcumina na faixa apolar, tornando-a mais hidrofóbica. Estas moléculas possuem também pequenas regiões na faixa de polaridade. A quercetina, devido aos seus hidrogênios, possui um pico negativo do

perfil  $\sigma$ , enquanto que no perfil  $\sigma$  da curcumina, pode ser observado uma área referente as regiões de ligação de hidrogênio devido à presença de oxigênios polares.

Assim, por meio da interface das biomoléculas geradas pelo modelo COSMO, foi encontrada a seguinte ordem de apolaridade: curcumina > quercetina > ácido gálico. Esse comportamento corresponde ao descrito pela análise dos valores de  $\log K_{OW}$ , citado anteriormente.

### 6.3.2 Determinação da solubilidade utilizando o modelo COSMO

Os modelos termodinâmicos tipo COSMO são baseados na química quântica e termodinâmica estatísticas, não utilizam dados experimentais e podem ser utilizados para prever o desvio da idealidade de misturas líquidas. COSMO-RS e COSMO-SAC, são exemplos desses modelos e foram aplicados neste trabalho para prever a solubilidade das biomoléculas nas soluções aquosas utilizadas. Para comparação dos resultados encontrados nestes dois modelos, foi utilizada a correlação de Pearson, em termos dos coeficientes de atividades obtidos, conforme apresentado na TABELA 12. Valores de correlação igual a zero indicam ausência de relação e iguais a  $\pm 1$ , correlação linear perfeita (positiva ou negativa). Para coeficientes maiores que  $\pm 0,5$ , um alto nível de correlação é observado (SAROUHAS, 2014).

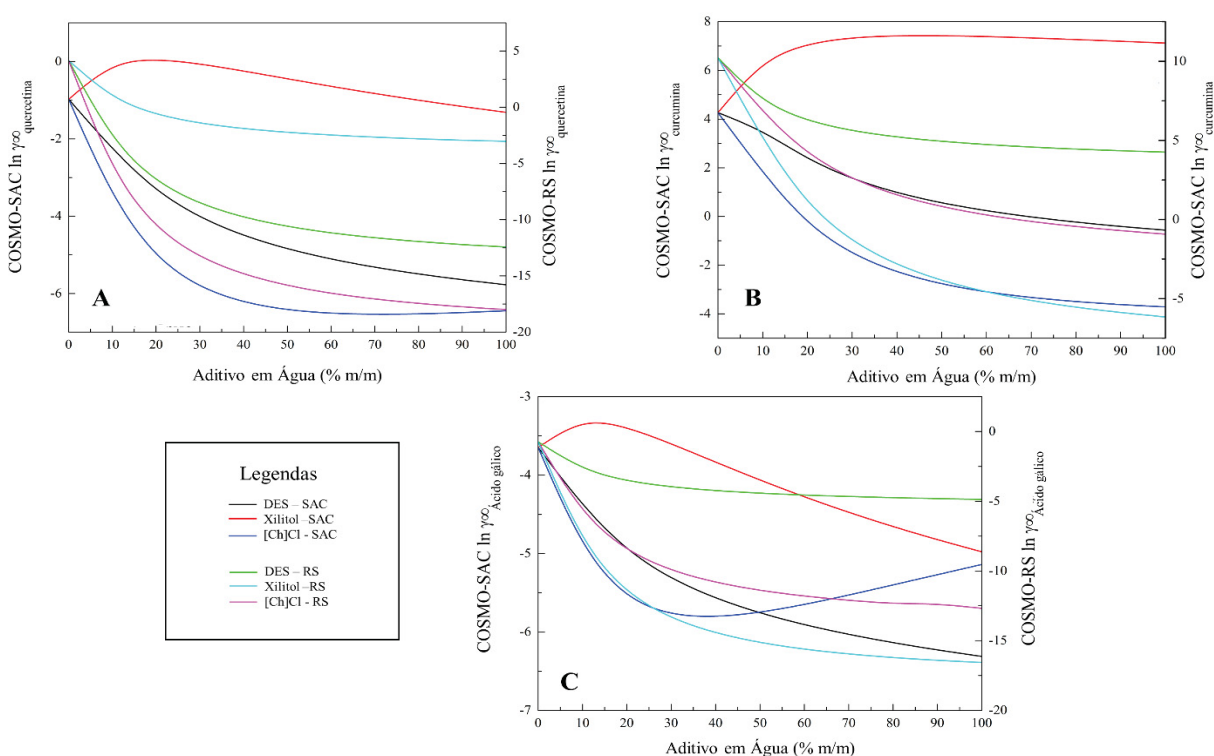
TABELA 12 - CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE  $\ln\gamma_{biomoleculas}^{\infty}$  PREDITAS POR COSMO-SAC E COSMO-RS, EM DIFERENTES SOLVENTES

COSMO-SAC / COSMO-RS	QUERCETINA	CURCUMINA	ÁCIDO GÁLICO
DES + Água	0,983	0,986	0,980
Xilitol + Água	0,214	-0,926	0,665
[Ch]Cl + Água	0,993	0,999	0,825

Como pode ser observado na TABELA 12, foram encontrados altas e positivas correlações, exceto para a mistura água e xilitol. Esta divergência, pode estar relacionada com as diferentes formas de otimização e parametrização empregadas em cada modelo utilizado. Apesar disso, com relação aos demais sistemas estudados, mesmo com essas diferenças, foi possível obter coeficientes de atividade semelhantes. Na FIGURA 38, a comparação dos resultados é apresentada e, da mesma forma, podem ser observados as semelhança e/ou divergência dos perfis  $\ln\gamma_{biomoleculas}^{\infty}$  preditos em diferentes sistemas.

Por meio dos dados experimentais, foi observado uma maior solubilidade da curcumina quando havia menores concentração de água nas misturas aquosas de xilitol (FIGURA 34). Esse comportamento foi previsto pelo modelo COSMO-RS, considerando a redução da  $\ln\gamma_{curcumina}^{\infty}$  quando ocorre aumento na concentração do aditivo, e não previsto pelo COSMO-SAC (FIGURA 38B). A solubilidade é inversamente proporcional ao coeficiente de atividade do composto, assim correlacionando esses dois parâmetros é possível a utilização de modelos preditivos como o COSMO para cálculo da solubilidade. Com os resultados obtidos para curcumina e quercetina (FIGURA 38A e 38B), pode se dizer que esses valores estão de acordo com os dados experimentais devido aos maiores valores negativos de  $\ln\gamma_{biomoleculas}^{\infty}$  em maiores teores de aditivos em água.

FIGURA 38 – PREDIÇÃO DO  $\ln\gamma_{biomoleculas}^{\infty}$  A) QUERCETINA; B) CURCUMINA E C) ÁCIDO GÁLICO, POR MEIO DO COSMO-SAC E COSMO-RS, EM DIFERENTES SISTEMAS, A 298,2 K



FONTE: a Autora (2022).

A solubilidade teórica das biomoléculas foi calculada através da equação do equilíbrio sólido líquido (Eq. 5), a 298,2 K utilizando as propriedades de fusão descritos na TABELA 13. Assim como os dados experimentais obtidos, as solubilidades previstas para as moléculas hidrofóbicas, quercetina e curcumina, aumentaram com

a presença do aditivo na água. Perfis semelhantes foram obtidos pelo COSMO-RS e pelo COSMO-SAC, FIGURA 38 A-D. Ambos, DES e [Ch]Cl, exibiram boa afinidade para moléculas hidrofóbicas, evidenciada pelo aumento significativo no  $\ln S/S_0$ . Além disso, devido às diferenças do coeficiente de atividade da curcumina predito pelo COSMO-RS e COSMO-SAC, utilizando xilitol como aditivo, perfis contrários de  $\ln S/S_0$  foram obtidos. Conforme mencionado acima, a previsão do COSMO-RS foi adequada para este sistema.

Ao se comparar os perfis  $\ln\gamma_{\text{ácido gálico}}^{\infty}$  obtidos pelo COSMO-RS e COSMO-SAC (FIGURA 39) e os dados experimentais, podem ser observadas semelhanças para o sistema com xilitol. Entretanto, para os sistemas com DES e [Ch]Cl, os resultados indicam comportamentos diferentes. O modelo COSMO-RS previu uma queda contínua no  $\ln\gamma_{\text{ácido gálico}}^{\infty}$  para ambos os sistemas, o que discorda dos dados experimentais correspondentes. O COSMO-SAC, por sua vez, revelou uma redução de  $\ln\gamma_{\text{ácido gálico}}^{\infty}$  até um ponto mínimo, e a posterior adição deste aditivo aumentou o  $\ln\gamma_{\text{ácido gálico}}^{\infty}$ , indicando um comportamento típico de um sistema contendo hidrótropo.

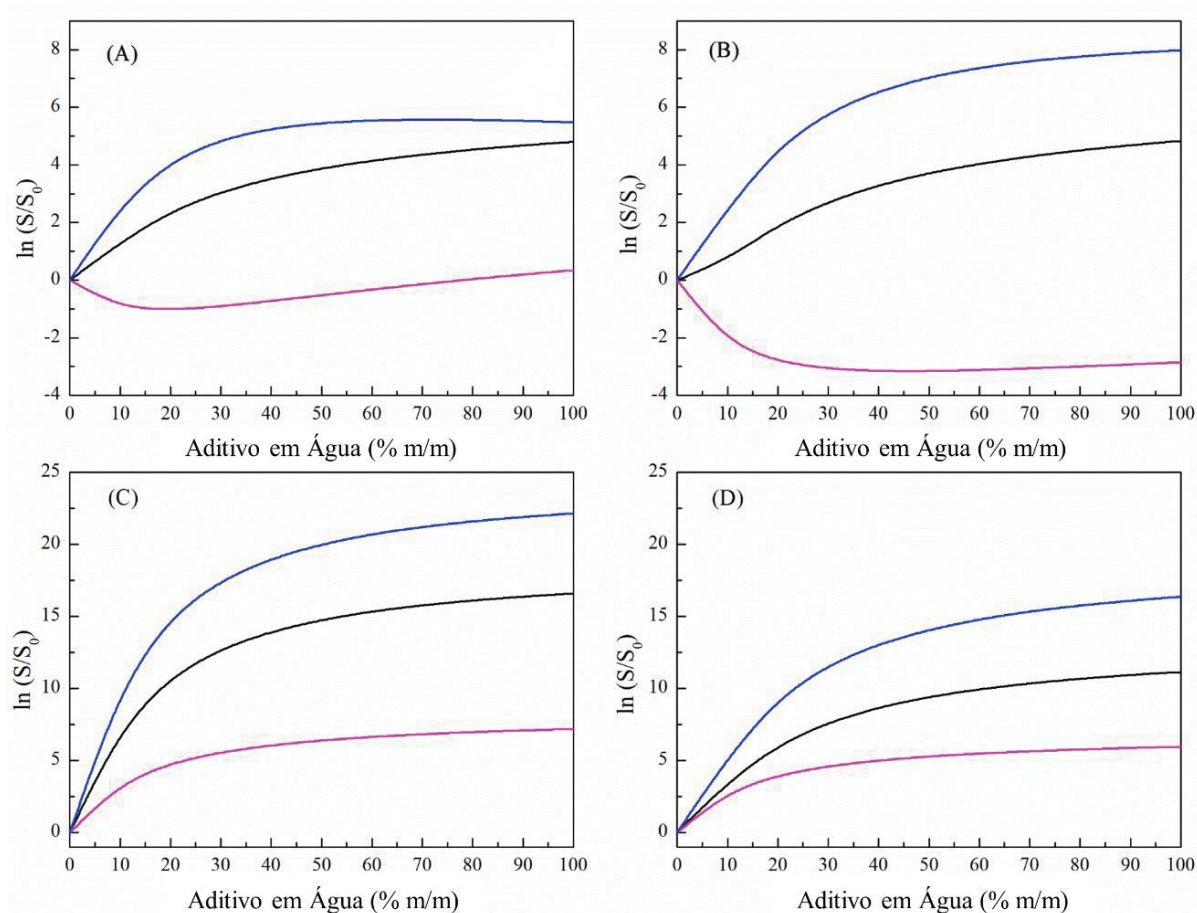
TABELA 13 - NOME, NÚMERO CAS E PROPRIEDADES DE FUSÃO PARA OS COMPOSTOS APLICADOS PARA PREVISÃO DE SOLUBILIDADE.

BIOMOLÉCULA	NÚMERO - CAS	$T_f$ (K)	$\Delta_f H$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	REFERÊNCIA
Ácido Gálico	149-91-7	640,98	47,0	(MISRA et al., 2007)
Quercetina	117-39-5	595,20	41,50	(CHEBIL et al., 2007)
Curcumina	458-37-7	447,15	52,23	(RATHI et al., 2019)

Assim como para os dados experimentais, a solubilidade prevista de quercetina e curcumina por COSMO-SAC e COSMO-RS (FIGURA 38) foi expressa em termos da solubilidade relativa (logaritmo natural da razão entre a solubilidade na mistura (aditivo + água) e água pura). A solubilidade relativa do ácido gálico também aumentou com o incremento do aditivo na água, FIGURA 40, de acordo com a previsão do COSMO-SAC. No entanto, foi observado um ligeiro aumento da solubilidade em comparação com as outras biomoléculas, uma vez que a solubilidade do ácido gálico em água pura é muito maior do que a da quercetina e curcumina (cerca de 4000 vezes). De fato, por meio do perfil sigma, FIGURA 37, notou-se uma área

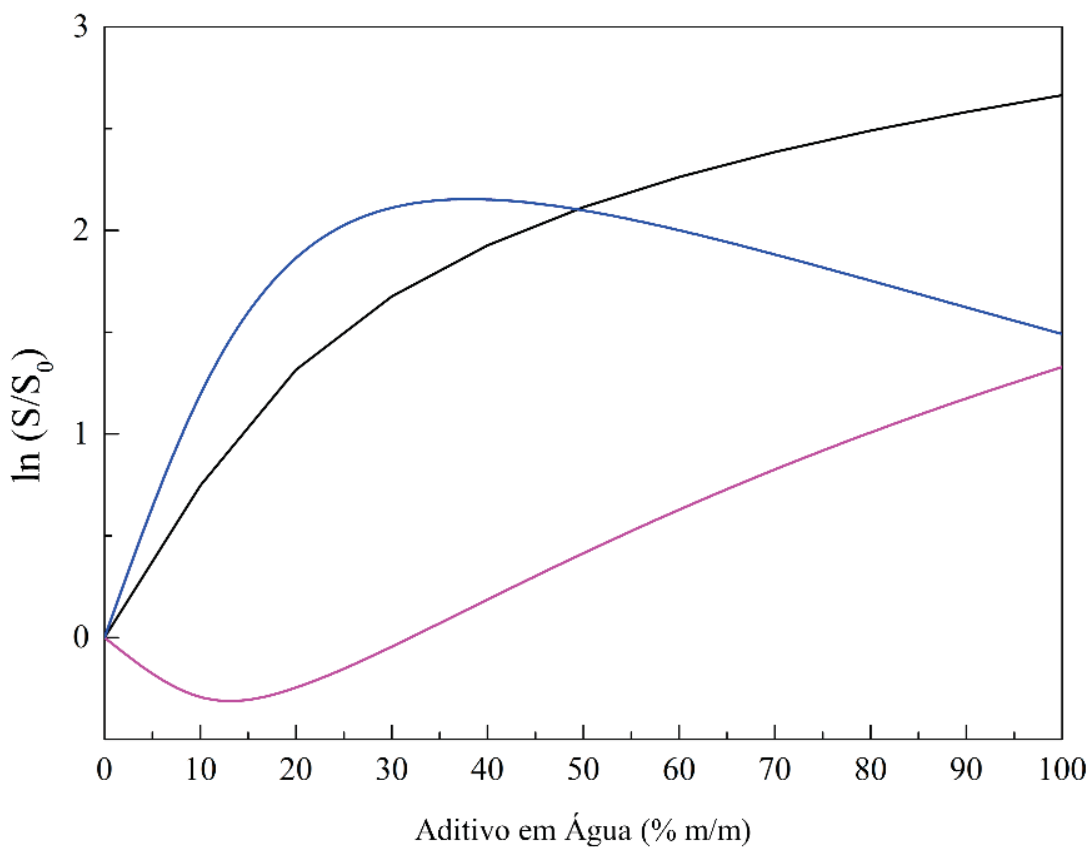
menor na faixa apolar, em comparação com a curcumina e a quercetina, o que significa menor caráter hidrofóbico e, portanto, maior afinidade com a água. Conforme apresentado anteriormente, em relação ao coeficiente de atividade do ácido gálico com [Ch]Cl como aditivo, um comportamento peculiar foi encontrado para a previsão do COSMO-SAC. Experimentalmente, um perfil semelhante foi encontrado para misturas de DES + água com ácido gálico como soluto.

FIGURA 39 - SOLUBILIDADE PREVISTA ( $\ln(S/S_0)$ ) POR COSMO-SAC DE: A) QUERCETINA E B) CURCUMINA; E COSMO-RS DE: C) QUERCETINA E D) CURCUMINA EM SOLUÇÕES AQUOSAS DE: (—) DES; (—) [Ch]Cl E (—) XILITOL



FONTE: a Autora (2022).

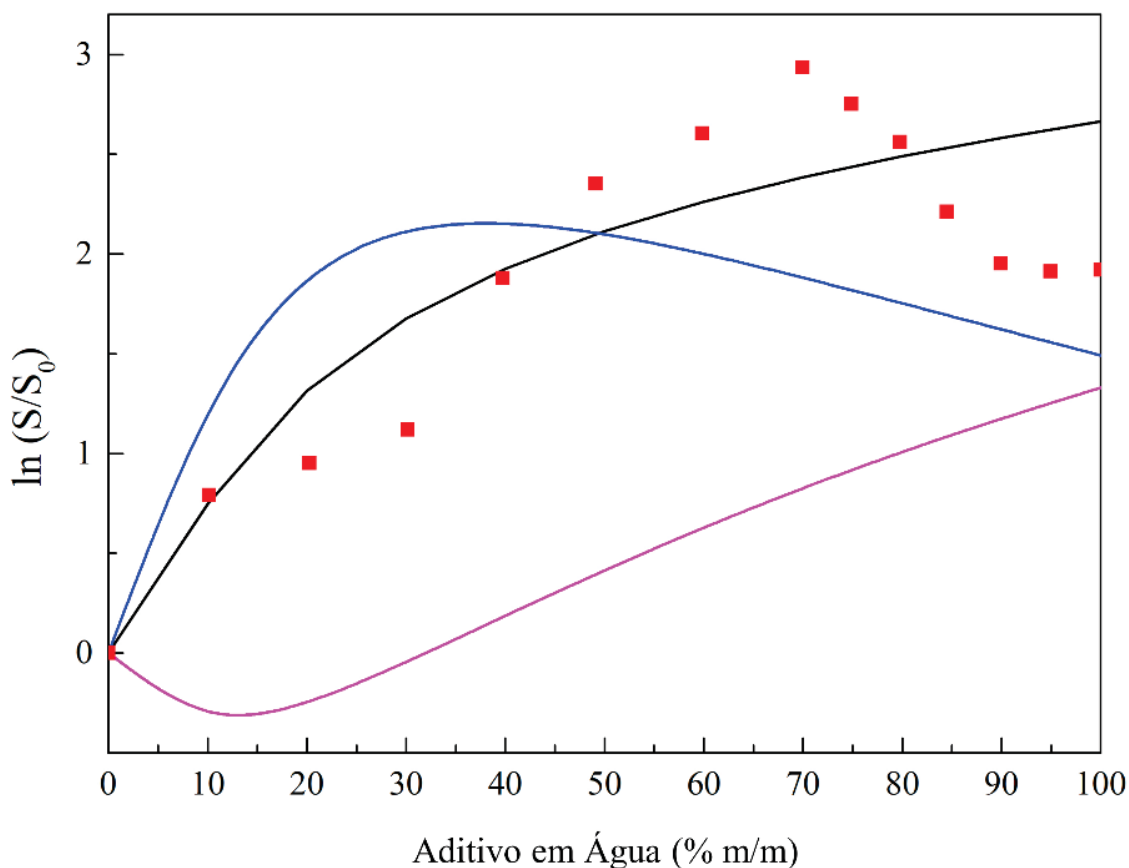
FIGURA 40 - SOLUBILIDADE PREVISTA ( $\ln(S/S_0)$ ) COSMO-SAC DO ÁCIDO GÁLICO EM SOLUÇÕES AQUOSAS DE: (—) DES; (—) [Ch]Cl E (—) XILITOL



FONTE: a Autora (2022).

Na FIGURA 41, para a molécula de ácido gálico, é importante ressaltar que o modelo COMO-SAC previu a formação de hidrótopo para solução aquosa com [Ch]Cl. A solubilidade aumenta até a concentração de 30% de aditivo e se mantém estável quando a concentração está em torno de 40% e, em concentrações acima desse valor para o [Ch]Cl, pode ser notada uma diminuição na solubilidade. Uma comparação entre os dados experimentais e previstos está disponível na FIGURA 40. O COSMO-SAC indicou este fenômeno para uma mistura diferente (sem doador de hidrogênio), possivelmente indicando que a [Ch]Cl orienta o efeito hidrotópico, conforme observado experimentalmente. Este resultado está de acordo com os dados da constante de Setschenow obtidos neste trabalho. Em relação a isso, o hidrotropo observado é baseado na interação entre o anel aromático do ácido gálico e os núcleos catiônicos do cloreto de colina (CLÁUDIO et al., 2015).

FIGURA 41 – SOLUBILIDADE ( $\ln(S/S_0)$ ) DO ÁCIDO GÁLICO EM: (■) DES – DADOS EXPERIMENTAIS; COSMO-SAC EM SOLUÇÕES AQUOSAS DE: (—) DES; (—) [Ch]Cl E (—) XILITOL



FONTE: a Autora (2022).

#### 6.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram obtidos dados experimentais da solubilidade das biomoléculas quercetina, curcumina e ácido gálico, em soluções aquosas compostas por DES (cloreto de colina + xilitol + 10% de água (m/m)), cloreto de colina, xilitol e na mistura de cloreto de colina + xilitol + água. As análises ocorreram em uma temperatura de 298,2 K utilizando a técnica de espectroscopia de UV-Vis para determinação da concentração das biomoléculas. Foi possível perceber que ambas as moléculas hidrofóbicas avaliadas, quercetina e curcumina, apresentaram uma maior solubilidade no sistema contendo cloreto de colina e água, havendo maior aumento quando o aditivo estava presente nas maiores concentrações. De modo geral, para todos os aditivos avaliados, houve um aumento na solubilidade dessas biomoléculas. Para o ácido gálico, molécula menos hidrofóbica, foi possível perceber o mesmo comportamento, exceto para o sistema contendo DES, para o qual foi possível

perceber um efeito hidrótropo, que se destaca por ser interessante nos processos industriais de separação de compostos. Por meio na mudança da concentração do aditivo ocorre o controle no aumento ou diminuição da solubilidade.

Os modelos COMO-SAC e COSMO-RS foram utilizados para cálculo do coeficiente de atividade dos sistemas e, conseqüente usados para prever o comportamento da solubilidade. Por meio desses resultados, assim como nos dados experimentais, foi possível perceber o aumento da solubilidade das biomoléculas com o aumento da concentração do aditivo. Além desses fatores, a partir dos resultados obtidos pelo modelo COSMO-SAC, foi possível observar a predição de um efeito hidrótropo para o sistema com [Ch]Cl para o ácido gálico. Este fato indica que o sal de amônio é o responsável pela ocorrência do efeito hidrótropo observado neste estudo.

## CAPÍTULO 7 – Solubilidade de biomoléculas em soluções aquosas de DES: Estudo experimental e *in silico* empregando COSMO-RS<sup>4</sup>

---

*Os dados apresentados a seguir são uma continuação do trabalho descrito no capítulo anterior. Neste tópico são apresentados dados de solubilidade da curcumina, ácido gálico e cafeína em soluções aquosas de DES, seus constituintes individuais, além da mistura simples de seus constituintes em temperatura de 298,15 K. O modelo COSMO-RS, foi empregado para auxiliar em uma melhor compreensão dos resultados experimentais, bem como no cálculo da polaridade de todas moléculas utilizadas no trabalho.*

### 7.1 SOLUBILIDADE DA CURCUMINA, ÁCIDO GÁLICO E CAFEÍNA

A solubilidade da curcumina, ácido gálico e cafeína foram avaliadas em diferentes soluções aquosas composta por DES1 e DES2, seus constituintes individuais a suas misturas simples (ver Tabela 2). Esses resultados foram apresentados em termos de solubilidade relativa ( $\ln(S/S_0)$ ), onde S corresponde à solubilidade da biomolécula em água + aditivo e  $S_0$  em água pura. As FIGURAS 42, 43 e 44, mostram os dados de solubilidade da curcumina, ácido gálico e cafeína, respectivamente. Para discussão posterior, foi avaliada a solubilidade da cafeína em DES3 e misturas contendo [Ch]Cl-Xilitol (2:1) como aditivo, conforme avaliado em nosso trabalho anterior (OLIVEIRA et al., 2020). Para auxiliar no melhor entendimento entre as interações moleculares dos sistemas avaliados, foi utilizado um modelo preditivo COSMO-RS, conforme descrito nas seções a seguir.

#### 7.1.2 Dados da solubilidade e cinética de dissolução da curcumina

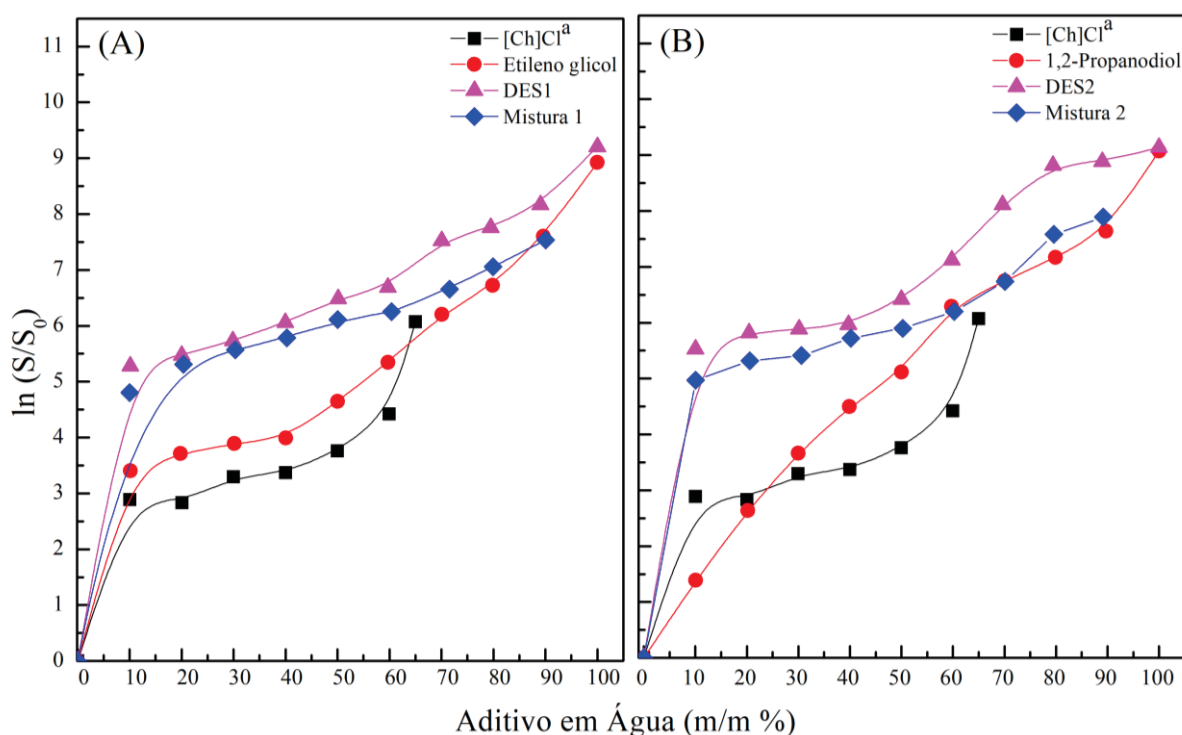
Por meio dos resultados mostrados no capítulo anterior (OLIVEIRA et al., 2020), foi possível notar que a adição dos aditivos cloreto de colina ([Ch]Cl), xilitol, [Ch]Cl + xilitol e DES ([Ch]Cl + xilitol (2:1, razão molar) + 10% de água (m/m), causou um aumento da solubilidade da curcumina em meio aquoso. Ou seja, todos os aditivos utilizados atuaram como cossolvente. Neste trabalho, com objetivo de buscar um melhor entendimento, e outros compostos alternativos capazes de atuarem como cos-

<sup>4</sup>Os resultados apresentados foram publicados no seguinte trabalho: OLIVEIRA, G.; FARIAS, F. O.; SOSA, F. H. B.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R. Green solvents to tune the biomolecules' solubilization in aqueous media: An experimental and in silico approach by COSMO-RS. **Journal of Molecular Liquids**. v. 341, 2021.

solventes, foi medida a solubilidade da curcumina em meio aquoso de soluções compostas por: DES utilizando álcoois como HBD's (1,2-propanodiol e etilenoglicol); mistura simples do [Ch]Cl + HBD, e os álcoois individuais. Os dados de solubilidade são apresentados a seguir.

Na FIGURA 42, é possível observar a solubilidade relativa ( $\ln(S/S_0)$ ) da curcumina nas soluções aquosas citadas anteriormente. Na TABELA 14, estão expressos os valores de solubilidade ( $\text{g.L}^{-1}$ ), não só da curcumina, mas também do ácido gálico e da cafeína.

FIGURA 42 – SOLUBILIDADE RELATIVA ( $\ln S/S_0$ ), DA CURCUMINA EM DIFERENTES SOLUÇÕES AQUOSAS EM TEMPERATURA DE 298,15 K



FONTE: a Autora (2022).

Pode ser observado, FIGURA 42, que todos os aditivos utilizados promoveram um aumento da solubilidade da curcumina em meio aquoso (de até 9000 vezes). Sendo que, a ordem dos aditivos que mais promoveram esse aumento é: DES2 > 1,2-P > EG > DES1 > M2 > M1 > [Ch]Cl. A curcumina é uma biomolécula hidrofóbica, com logaritmo da partição octanol-água ( $\text{Log } K_{OW}$  de 3,2) e, conseqüentemente apresenta baixa solubilidade em água pura ( $S_0 = 0,001 \text{ g.L}^{-1}$ , conforme TABELA 14). Além do efeito cossolvente causado por esses aditivos, é possível notar a importância

do preparo do DES e das ligações de hidrogênio que os forma, uma vez que estes fatos influenciaram na solubilidade da curcumina, principalmente na região com baixa concentração de água (> 50% em peso do aditivo), principalmente na comparação entre DES1 e M1. A maior solubilidade da curcumina foi alcançada quando foi utilizado os dois DES como aditivos, isso, comparado com as misturas simples de seus constituintes (HBA e HBD). Com relação aos HBD's, o etilenoglicol foi o composto que ocasionou a maior solubilização da curcumina.

As diferenças nas solubilidades quando foram utilizados o DES e a mistura simples de seus constituintes, observados neste e no capítulo anterior, reforçam a importância do preparo ideal do DES, e, a influência das ligações de hidrogênio na capacidade de solubilização. Este fato deixa de ser observado em altas concentrações de água, com conseqüente redução na concentração dos aditivos. Conforme já relatado na literatura, certas quantidades de água quebram as ligações de hidrogênio que formam o DES, sendo assim, neste ponto esses solventes se tornam uma mistura simples de seus constituintes. Vale ressaltar que, as quantidades ou concentrações de água necessárias para a ruptura dessas ligações, depende da composição e dos constituintes do solvente (VILKOVÁ et al., 2020). Sendo assim, tal fato reforça que não é possível afirmar que a mesma concentração de água quebrará ou não as ligações de hidrogênio de todos os DES possíveis de serem preparados. Além disso, a importância no preparo adequado do DES é reforçada para sua adequada e eficiente aplicação, bem como, para atingir as propriedades adequadas para cada DES.

O DES2 teve uma capacidade em dissolver a curcumina 9000 vezes mais em relação a água pura. Dessa forma, sabendo que além do estudo do tipo de solventes e cossolventes adequados para um processo de extração eficaz, o tempo também é um parâmetro importante para a viabilidade desses processos.

Esses fatos se destacam principalmente em escala industrial, sendo que é necessário atingir a máxima eficiência no menor tempo possível, com propósito de reduzir custos. Sendo assim, a influência do tempo na dissolução da curcumina foi avaliada, conforme FIGURA 43.

TABELA 14 – SOLUBILIDADE (g.L<sup>-1</sup>) DA CURCUMINA, ÁCIDO GÁLICO E CAFEÍNA EM ÁGUA COM DIFERENTES ADITIVOS, EM TEMPERATURA DE 298,15 K

[Ch]C <sup>1a</sup> (m/m)	S g.L <sup>-1</sup>	EG <sup>b</sup> (m/m %)	S g.L <sup>-1</sup>	DES1 (m/m %)	S g.L <sup>-1</sup>	M1 <sup>c</sup> (m/m %)	S g.L <sup>-1</sup>	1,2- P <sup>d</sup> (m/m %)	S g.L <sup>-1</sup>	DES2 (wt. %)	S g.L <sup>-1</sup>	M2 (m/m %)	S g.L <sup>-1</sup>
<b>CURCUMINA</b>													
0,000	0,001	10,12	0,030	10,14	0,197	9,99	0,122	10,08	0,004	10,04	0,252	10,06	0,144
10,05	0,018	19,8	0,041	20,04	0,238	20,36	0,202	20,29	0,014	20,45	0,336	20,57	0,204
20,06	0,017	30,18	0,049	29,87	0,309	30,34	0,262	30,01	0,039	30,12	0,359	30,61	0,224
29,96	0,027	40,07	0,054	39,98	0,427	40,28	0,325	39,92	0,090	39,73	0,391	40,2	0,306
40,02	0,029	50,01	0,104	50,14	0,654	50,06	0,450	50,04	0,167	50,14	0,612	50,29	0,365
50,02	0,043	59,74	0,210	59,69	0,806	60,4	0,519	59,77	0,541	59,79	1,240	60,27	0,493
59,99	0,083	70,09	0,494	70,04	1,855	71,59	0,775	70,08	0,850	69,63	3,341	70,12	0,846
65,45	0,434	79,87	0,834	79,49	2,346	79,93	1,164	79,94	1,298	79,43	6,742	79,59	1,961
69,96	0,976	89,65	2,003	89,05	3,521	90,08	1,880	89,68	2,078	88,98	7,234	89,17	2,674
		100,0	7,513	100,0	9,022			100,0	8,723	100,0	9,279		
<b>ÁCIDO GÁLICO</b>													
0	6,617	10,12	18,38	10,14	29,58	9,99	27,83	10,08	11,95	10,04	26,95	10,06	20,02
10,12	15,02	19,86	24,25	20,04	33,83	20,36	34,91	20,2	21,89	20,45	29,97	20,57	28,91
20,37	20,53	30,18	32,81	29,87	55,71	30,34	54,41	30,01	32,77	30,12	50,11	30,61	60,28
28,07	41,46	40,07	46,26	39,98	88,21	40,28	78,67	39,92	43,92	39,73	92,82	40,2	89,79
40,29	72,71	50,01	58,25	50,14	125,5	50,06	110,1	50,04	47,84	50,14	105,4	50,29	113,2
49,94	98,06	59,74	57,85	59,69	132,8	60,4	124,9	59,77	39,02	59,79	121,8	60,27	135,1
60,03	127,1	70,09	48,61	70,04	132,2	71,59	141,7	70,08	27,19	69,63	134,3	70,12	159,9
70,02	159,6	79,87	38,35	79,49	98,22	79,93	167,1	79,94	19,72	79,43	180,3	79,59	191,3
		89,65	26,20	89,05	60,55	90,08	215,6	89,68	16,17	88,98	189,2	89,17	161,5
		100,0	30,07	100,0	59,55			100,0	15,26	100,0	136,8		
<b>CAFEÍNA</b>													
0	35,76	10,12	10,56	10,54	0,041	9,09	0,038	10,08	29,28	10,18	0,032	19,03	0,026
10,15	22,82	19,86	15,75	20,01	0,034	17,97	0,039	20,2	25,44	20,09	0,029	25,69	0,022

continuação

20,48	10,13	30,18	16,48	28,32	0,026	27,26	0,021	30,01	25,53	29,75	0,022	36,1	0,019
28,07	7,328	40,07	19,5	39,49	0,019	35,96	0,018	39,92	25,27	40,04	0,019	44,53	0,014
41,15	4,545	50,01	19,88	50,14	0,014	44,96	0,015	50,04	19,99	50,14	0,014	59,77	0,011
49,94	2,601	59,74	16,19	57,75	0,012	52,41	0,012	59,77	20,96	59,92	0,011	61,97	0,013
60,03	1,168	70,09	14,05	60,13	0,011	62,98	0,011	70,08	19,85	69,04	0,009	71,63	0,009
70,02	0,963	79,87	12,99	76,22	0,007	71,64	0,014	79,94	12,60	78,92	0,007	80,23	0,008
		89,65	9,077	89,48	0,004	80,23	0,007	89,68	9,769	88,01	0,005	90,91	0,008
		100,0	8,253	100,0	0,006	90,91	0,006	100,0	8,300	100,0	0,004		

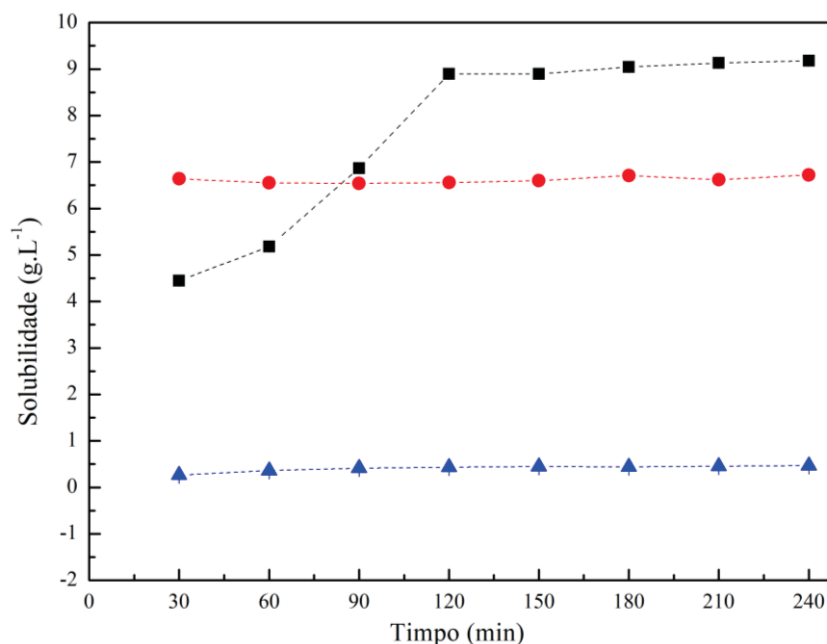
<sup>a</sup>Dados publicados no trabalho referente ao capítulo anterior (OLIVEIRA et al., 2020); <sup>b</sup>Etileno Glicol; <sup>c</sup>Mistura dos constituintes do DES1; <sup>d</sup>1,2-Propanodiol; Mistura dos constituintes do DES1; As incertezas das medidas são:  $u(P) = 10 \text{ kPa}$ ;  $u(T) = 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $u(m/m \%) = 0,01\%$  e  $u(S) = 0,006\text{g.L}^{-1}$ .

TABELA 15 - SOLUBILIDADE ( $\text{g.L}^{-1}$ ) DA CAFEÍNA EM ÁGUA COM DIFERENTES ADITIVOS, EM TEMPERATURA DE 298,15 K

Cafeína						
Xilitol (m/m %)	S ( $\text{g.L}^{-1}$ )	DES3 (m/m %)	S ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Mistura 3 <sup>a</sup> (mm %)	S ( $\text{g.L}^{-1}$ )	
10,02	0,959	39,75	0,352	29,79	0,462	
20,02	0,805	49,08	0,248	39,55	0,326	
30,10	0,701	59,81	0,197	49,02	0,235	
40,24	0,530	69,94	0,149	59,64	0,186	
50,33	0,415	79,78	0,126	69,88	0,154	
		89,92	0,122			
		100,0	0,120			

<sup>a</sup>Mistura dos constituintes do DES3; As incertezas das medidas são:  $u(P) = 10 \text{ kPa}$ ;  $u(T) = 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $u(m/m \%) = 0,01\%$  e  $u(S) = 0,006\text{g.L}^{-1}$

FIGURA 43 – CINÉTICA DE DISSOLUÇÃO DA CURCUMINA EM: (---■---) DES2; (---●---) DES2 + 20% DE ÁGUA (m/m) e (---▲---) DES2 + 80% DE ÁGUA (m/m)



FONTE: a Autora (2022).

A cinética de dissolução foi realizada utilizando três solventes, sendo eles: DES2, DES2 + 20% de água (m/m) e DES2 + 80% de água (m/m). A escolha dos solventes se deu para avaliar a dissolução com o DES puro, com uma baixa concentração de água (20%) e uma alta (80%). Na FIGURA 43, pode ser observado dois diferentes comportamentos para os três sistemas. Para ambas as misturas do DES2 com a água, a saturação foi alcançada em tempo inferior a 30 minutos de agitação. Em comparação ao DES2 puro, nesse mesmo intervalo de tempo, apenas 50% da solubilização máxima foi alcançada (4,45 g. L<sup>-1</sup>). Neste sistema, o tempo necessário para a saturação foi de 120 minutos, ou seja, foi nesse ponto que os valores de solubilização se aproximaram da máxima (9275 g.L<sup>-1</sup>).

Conforme já relatado, o tempo de solubilização da curcumina é menor para as misturas DES2 + Água em comparação ao DES2, isso pode ser atribuído ao fato de que a capacidade de solubilização é menor, bem como a menor viscosidade desses sistemas. A adição de água reduz significativamente a viscosidade do DES, melhorando o fenômeno de transferência de massa, atingindo uma taxa de dissolução rápida conforme já era esperado (DAI et al., 2013). Como todos os DES, de modo geral, possuem uma viscosidade maior que a da água, era esperado que o processo de dissolução fosse maior quando comparado as misturas DES + Água (ALANÓN et

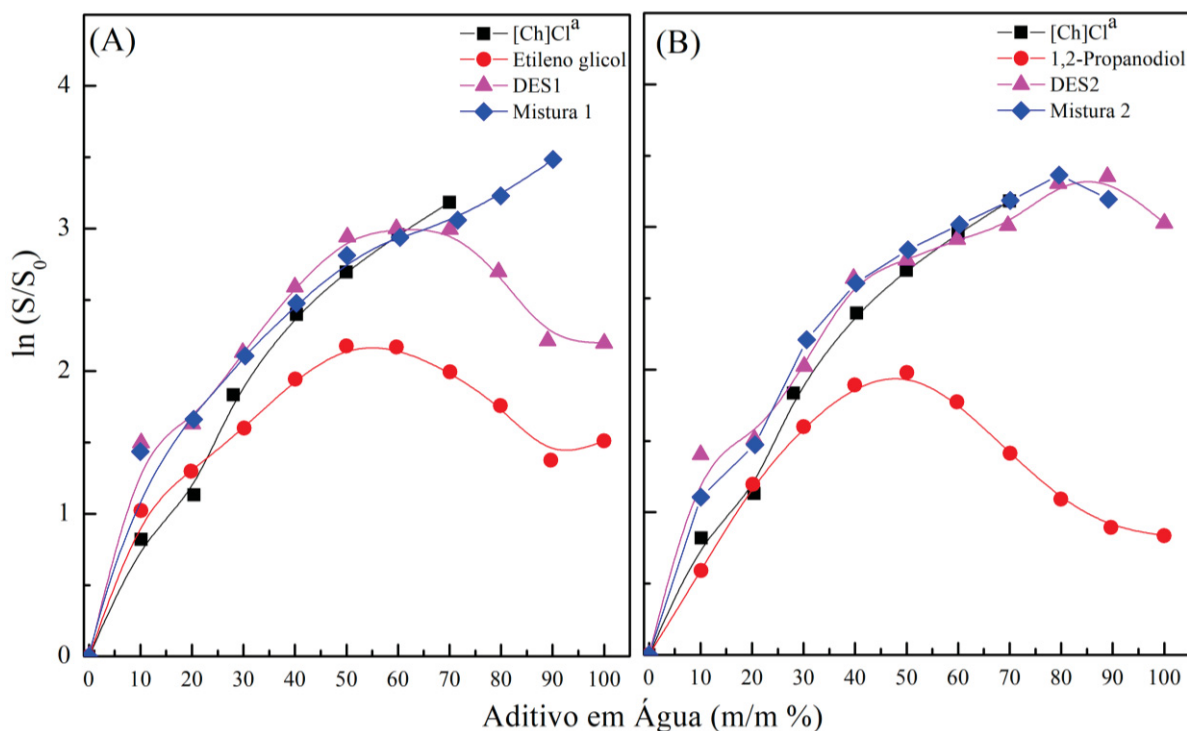
al., 2020). A viscosidade pode prejudicar o processo de transferência de massa e, conseqüentemente, diminuir a taxa de dissolução no estágio final (RADWAN et al., 2012; DIAS et al., 2020).

Os resultados da cinética de dissolução da curcumina mostraram que a adição de água no DES2, como já era esperado, contribuiu para que houvesse uma dissolução mais rápida. No entanto, para essas misturas, foi possível observar uma menor capacidade de solubilização da curcumina. Dessa forma, por meio desses fatos, fica claro a importância e necessidade de estudos prévios de tempo e capacidade de solubilização, para melhor eficiência nos processos de extração e separação, buscando encontrar as variáveis mais influentes durante o processo.

### 7.1.2 Dados de solubilidade do ácido gálico e da cafeína

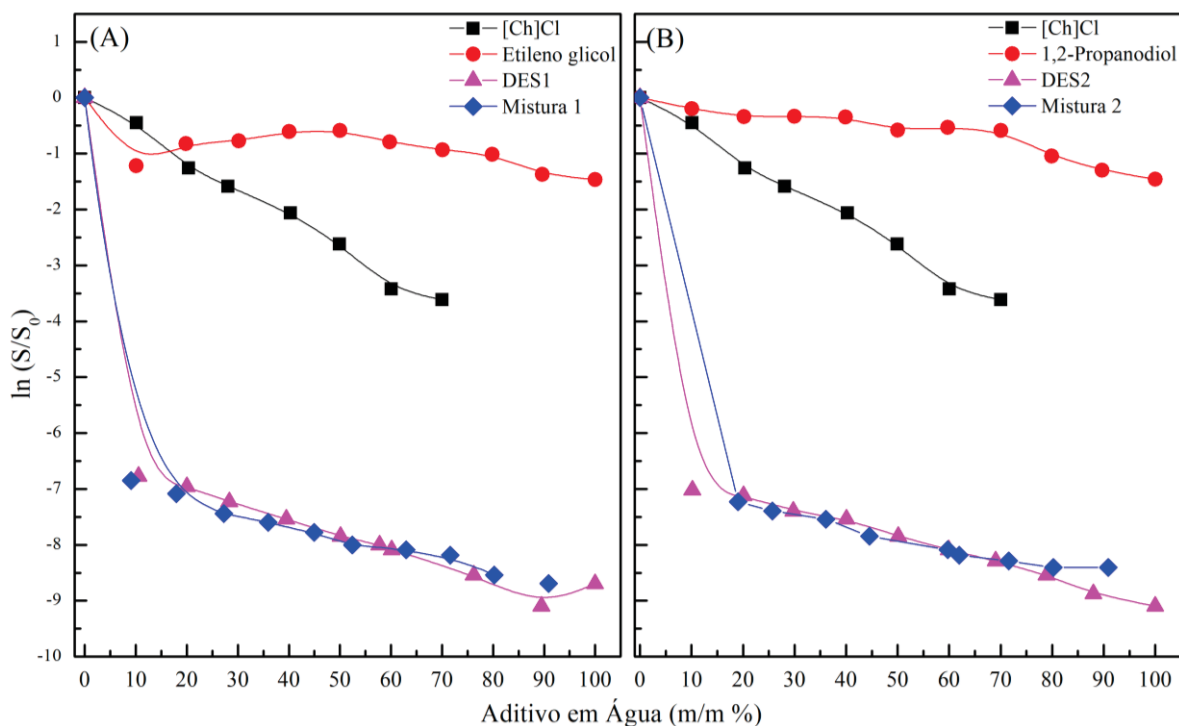
Sendo um ácido fenólico e um alcaloide, respectivamente, o ácido gálico e cafeína, esses compostos apresentam um caráter hidrofílico elevado em relação a curcumina. Nas FIGURAS 44 e 45, estão expressos os valores da solubilidade relativa ( $\ln(S/S_0)$ ) do ácido gálico e da cafeína, nas soluções aquosas citadas na TABELA 2. Os valores de solubilidade absoluta são mostrados na TABELA 14.

FIGURA 44 - SOLUBILIDADE RELATIVA ( $\ln S/S_0$ ), DO ÁCIDO GÁLICO EM DIFERENTES SOLUÇÕES AQUOSAS EM TEMPERATURA DE 298,15 K



FONTE: a Autora (2022).

FIGURA 45 - SOLUBILIDADE RELATIVA ( $\ln(S/S_0)$ ), DA CAFEÍNA EM DIFERENTES SOLUÇÕES AQUOSAS EM TEMPERATURA DE 298,15 K



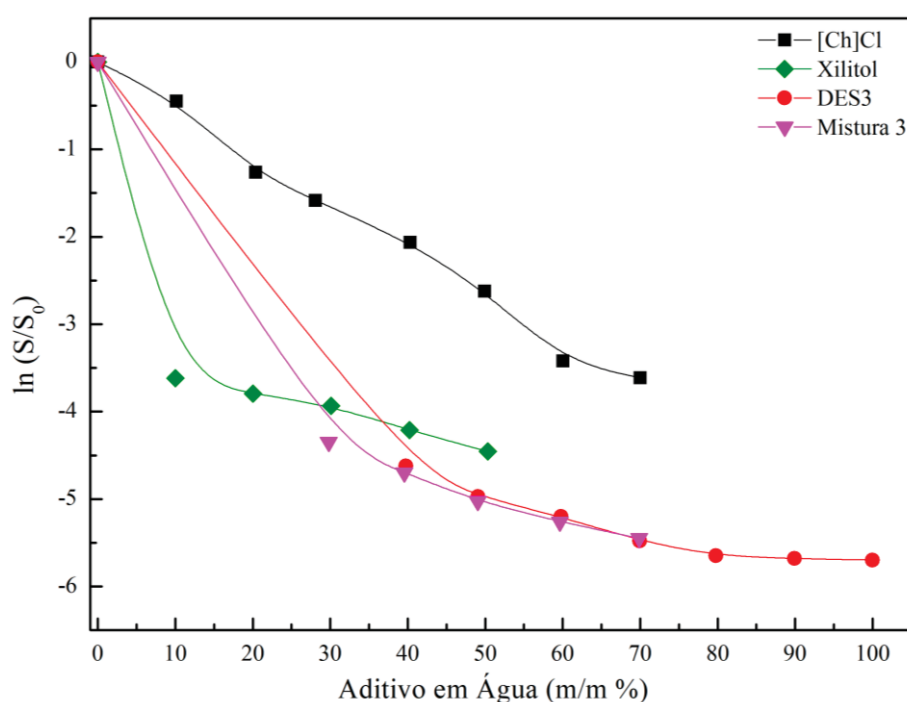
FONTE: a Autora (2022).

De acordo com os resultados obtidos, e como pode ser observado na FIGURA 44, a capacidade de cada aditivo em aumentar a solubilidade do ácido gálico seguiu a ordem de: M1 > M2 > DES2 > DES1 > [Ch]Cl > EG > 1,2-P. Bem como observado no capítulo anterior, alguns aditivos, exceto [Ch]Cl e M1, promoveram o efeito hidrótopo sobre o ácido gálico, fato que será discutido nos próximos capítulos.

Na FIGURA 45, pode ser encontrado os dados, solubilidade relativa ( $\ln(S/S_0)$ ), da cafeína nas soluções aquosas já descritas, conforme TABELA 2. Ao contrário do observado na solubilidade da curcumina e ácido gálico, todos os aditivos utilizados promoveram a redução da solubilidade da cafeína quando comparada a água pura. A cafeína, em comparação ao ácido gálico e curcumina, é uma molécula mais hidrofílica ( $\log k_{ow}$  de -0,55). Dessa forma, ocorre uma competição entre os aditivos e a cafeína em formar complexos de hidratos com a água, sendo assim, predominante o efeito dos aditivos em formarem essas ligações com a água. A capacidade de cada aditivo para aumentar a solubilidade da cafeína seguiu a ordem de: 1,2-P > EG > [Ch]Cl > M2 > M1 > DES1 > DES2.

Conforme descrito no capítulo anterior, a solubilidade da curcumina, quercetina e ácido gálico foram avaliados em soluções aquosas compostas por DES3, M3 e seus constituintes individuais ([Ch]Cl e XY). Dessa forma, a solubilidade da cafeína nessas soluções aquosas também foi medida, conforme FIGURA 46 e TABELA 15. O mesmo comportamento foi observado, em relação as outras soluções aquosas, ou seja, todos os aditivos causaram uma redução na solubilidade da cafeína em relação a água pura.

FIGURA 46 - SOLUBILIDADE RELATIVA ( $\ln(S/S_0)$ ), DA CAFEÍNA EM DIFERENTES SOLUÇÕES AQUOSAS EM TEMPERATURA DE 298,15 K



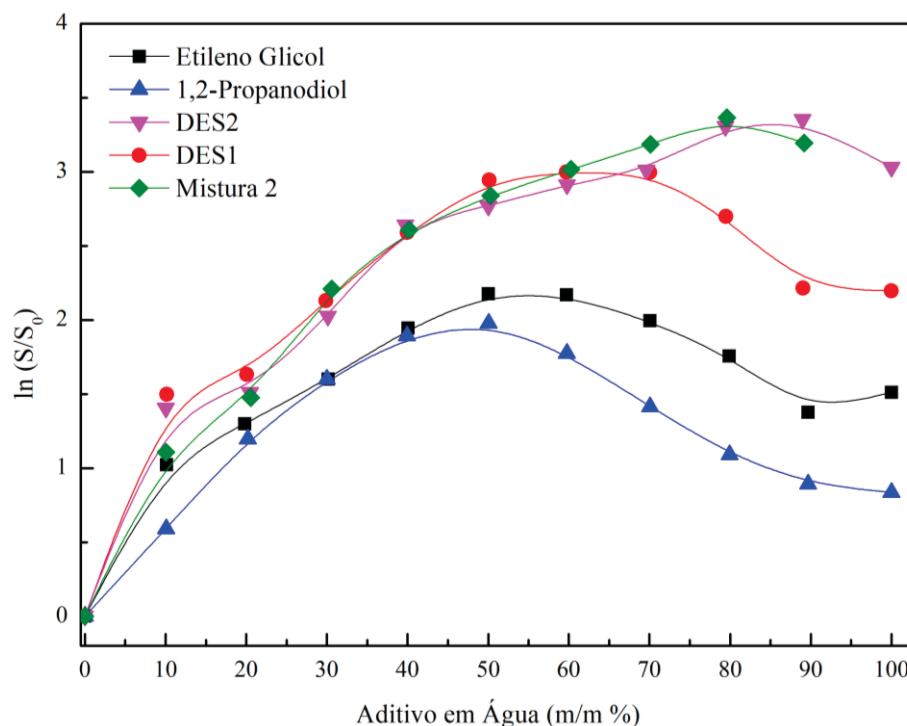
FONTE: a Autora (2022).

## 7.2 HIDROTROPIA

Conforme relatado anteriormente, a adição de alguns aditivos na água promoveu o efeito hidrotrópico na solubilidade do ácido gálico. Todos esses sistemas estão apresentados na FIGURA 47. Uma discussão sobre hidrotropia é apresentada no capítulo anterior.

As maiores solubilidades foram alcançadas quando DES2 ou M2 foi o aditivo em uma concentração em torno de 80% (m/m). Quando DES1, EG ou 1,2-P foram os aditivos, a maior solubilidade ocorreu em torno de 50%, seguida da redução em concentrações de aditivos maiores.

FIGURA 47 – SOLUÇÕES AQUOSAS QUE GERARAM EFEITO HIDROTRÓPO NO ÁCIDO GÁLICO



FONTE: a Autora (2022).

A constante de Setschenow ( $K_H$ ) foi determinada de acordo com a Equação (12) apresentada no capítulo anterior, e, conforme já relatado, a  $K_H$  auxilia na compreensão e entendimento do efeito hidrotrópico, bem como relacionar a preferência do soluto em interagir com o aditivo ao invés da água. Os valores de  $K_H$  encontrados para sistemas com ácido gálico e soluções aquosas seguiram a ordem:  $DES2 \approx M2 \approx DES1 > EG > 1,2\text{-Prop}$ , com os valores de, 0,44, 0,43, 0,43, 0,27 e 0,25, respectivamente. Maiores valores de  $K_H$  indicam que é maior a capacidade de solubilização do soluto em determinado solvente, ou seja, a ordem obtida está de acordo com a FIGURA 47.

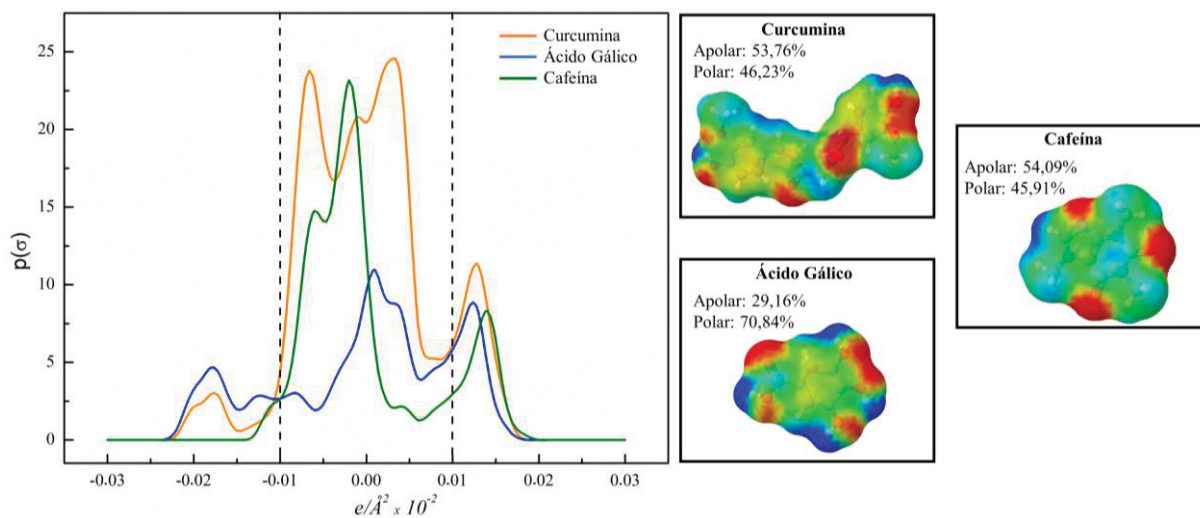
O maior efeito hidrotrópico na solubilidade do ácido gálico ocorreu para os sistemas de DES2, M2 e DES1. O fator comum de todos esses aditivos é a presença do [Ch]Cl. Conforme relatado anteriormente, quando o [Ch]Cl utilizado puro como aditivo, um aumento constante do ácido gálico foi alcançado. Contudo, quando combinado com algum HBD, um efeito hidrotrópico mais forte foi alcançado em comparação com o HBD puro. Esse fato reforça a hipótese de que os sais quaternários de amônio, como o [Ch]Cl, têm uma grande contribuição para a solubilidade de

biomoléculas e a necessidade de se avaliar diferentes misturas, dado o conceito de designer de solvente, caso dos DES.

### 7.3 COSMO-RS

Na FIGURA 48, encontra-se os perfis  $\sigma$  das biomoléculas utilizadas neste trabalho (curcumina, ácido gálico e cafeína). Já na FIGURA 49, estão apresentados os perfis sigma dos HBA e HBD's empregados para o preparo dos DES e aplicados como aditivos ([Ch]Cl, etilenoglicol, 1,2-propanodiol, xilitol e água), respectivamente. Os perfis  $\sigma$  foram obtidos por meio do modelo COSMO-RS. Estes perfis foram feitos, com intuito de melhor avaliar e compreender as diferentes polaridades características das biomoléculas. Com base na distribuição do potencial  $\sigma$  em diferentes regiões, as propriedades nas interações intermoleculares das ligações de hidrogênio dos substratos e produtos podem ser analisadas e avaliadas (SALLEH et al., 2017).

FIGURA 48 – PERFIL SIGMA E SUPERFÍCIE 3D DA CURCUMINA, ÁCIDO GÁLICO E CAFEÍNA (EMPREGANDO O COSMO-RS)

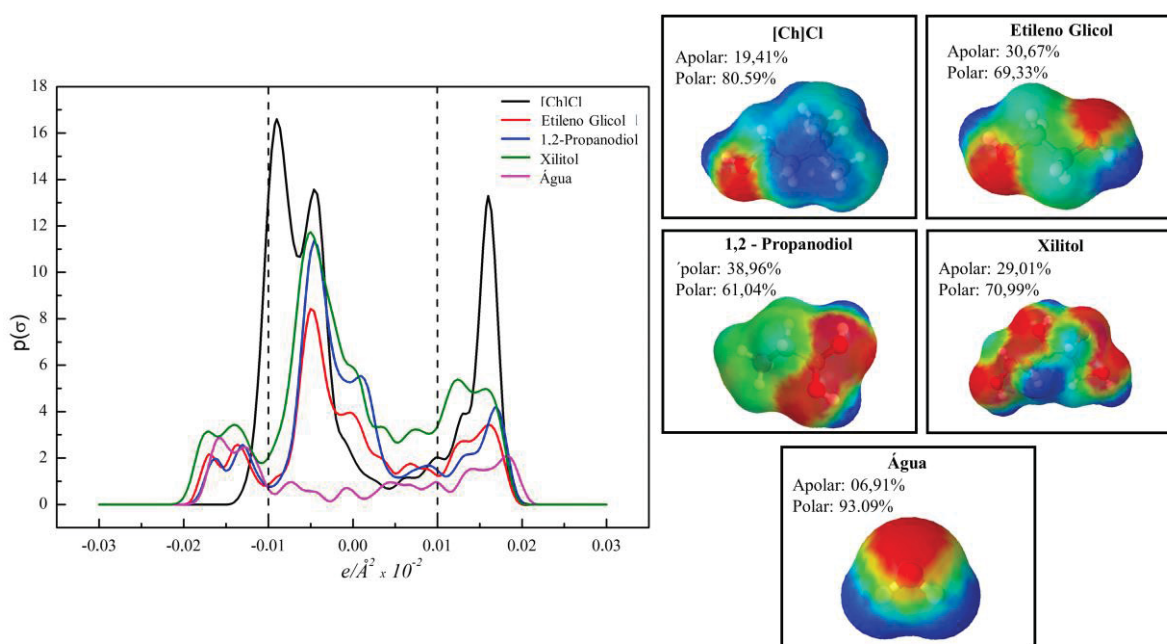


FONTE: a Autora (2022).

A polaridade pode ser definida de acordo com a forma da molécula, podendo ser simétricas ou não, devido ao arranjo de suas cargas elétricas (FARKAS, 1999). Em termos das áreas das regiões apolares, como pode ser observado nas FIGURAS 48 e 49, as biomoléculas mais apolares seguem a ordem: cafeína > curcumina > ácido

gálico, com relação aos constituintes usados como aditivos, a apolaridade segue a seguinte ordem: 1,2-P > EG > XY > [Ch]Cl > Água.

FIGURA 49 - PERFIL SIGMA E SUPERFÍCIE 3D DO CLORETO DE COLINA ([Ch]Cl), ETILENO GLICOL, 1,2-PROPANODIOL, XILITOL E ÁGUA (EMPREGANDO O COSMO-RS)



FONTE: a Autora (2022).

Alguns estudos, sugerem que a fração apolar ou hidrofóbica, é a parte responsável pela força motriz que gera a interação entre soluto e aditivo, quando há presença de água (BOOTH; ABBOTT; SHIMIZU, 2012; BOOTH; ABBOTT; SHIMIZU, 2015). A interação entre a água e o soluto é mais fraca do que a interação entre a água e a água, uma vez que são compostas por ligações de hidrogênio. Devido a isso, a forte interação entre soluto e hidrótopo, na presença de água, ocorre por meio da associação entre as porções hidrofóbicas dessas moléculas, fato que gera aglomeração do hidrótopo em torno do soluto. Conforme descrito anteriormente, o efeito hidrótopo foi observado nos sistemas compostos por ácido gálico. Os aditivos geraram aumento na solubilidade da curcumina, enquanto a cafeína mostrou uma redução na solubilidade em comparação com a solubilidade em água pura. Assim, para uma melhor compreensão dessas interações, estudos baseados em hidrotropia foram comparados em todos os sistemas. Corroborando com esse fato, Abranches e colaboradores (2020), descreveram que a interação hidrofóbica entre um aditivo e um

soluto em meio aquoso é a força motriz para o acúmulo do aditivo. Dessa forma, o cálculo da porcentagem de apolaridade obtida com o uso do COSMO-RS, auxilia na compreensão dessas interações. Nesse mesmo trabalho, os autores verificaram através da técnica de ressonância magnética nuclear (RMN), que as metades apolares dos hidrótopos têm propensão estatisticamente menor para interagir com a água, sugerindo a ideia de associação das metades apolares dos hidrótopos e as porções não polares do soluto, favorecendo o aumento da solubilidade.

Apesar de a cafeína ser o soluto com maior percentual de cargas apolares, foi a única biomolécula que teve redução da solubilidade em relação a água pura, na presença de aditivos. Este fato, pode ser relacionado com o tamanho da cadeia química da cafeína com massa molar de  $194,19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , que é bem menor que a curcumina com massa molar de  $368,38 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , por exemplo, reduzindo a superfície de contato entre soluto e aditivo. Em relação ao ácido gálico, o efeito hidrotópico foi observado devido ao menor percentual de cargas de apolaridade. Essa biomolécula apresenta a apolaridade mais próxima a apolaridade dos aditivos, quando comparada à curcumina e a cafeína. Esse fato está de acordo com a hipótese de que o número de hidrótopos ao redor do soluto é máximo quando ambos, hidrótopo e soluto, possuem similaridade na apolaridade.

#### 7.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, foi determinada a solubilidade da curcumina, do ácido gálico e da cafeína em temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , em diferentes soluções aquosas. Essas soluções, foram compostas por diferentes DES, seus constituintes individuais e a mistura desses constituintes. Os resultados mostraram diferentes comportamentos nesses sistemas. A solubilidade da curcumina aumentou com a adição de todos os aditivos, em comparação com a água pura. A cafeína, por sua vez, apresentou comportamento contrário, quando os aditivos promoveram redução significativa de sua solubilidade. Para o ácido gálico, a maior parte dos aditivos avaliados resultou em efeito hidrotópico.

Os processos industriais possuem grande interesse em sistemas que apresentam o efeito hidrotópico, visto que esse fato permite a manipulação da solubilização ou precipitação da biomolécula alvo. Adicionalmente, nos sistemas estudados, a combinação entre [Ch]Cl e HBD parece ser essencial para alcançar um

maior efeito hidrotópico, conforme observado pela constante de Setschenow, reforçando a aplicabilidade do conceito de designer de solvente.

Por meio do emprego do modelo preditivo COSMO-RS, foi possível calcular a porcentagem de polaridade das biomoléculas, aditivos e água, estudadas. Essa ferramenta, auxiliou e ajudou na compreensão e entendimento frente a interação desses compostos. Contudo, foi possível observar que, além desses percentuais, outros fatores influenciam a solubilização, como a linearidade e o tamanho da cadeia química dos constituintes de um determinado sistema.

Além da solubilidade, a cinética de solubilização da curcumina foi avaliada. Embora os maiores índices de solubilidade tenham sido alcançados em maiores concentrações de DES, observou-se que a adição de água aumenta a velocidade de saturação do sistema, com conseqüente redução da viscosidade desses solventes. O fato de a velocidade de saturação do sistema com DES puro ser menor quando comparado com sistemas onde água foi adicionada, ocorre devido à alta viscosidade do DES, que afeta diretamente o processo de transferência de massa.

Por fim, os resultados encontrados neste estudo mostram que a interação molecular e a solubilização são processos complexos, influenciados e dependentes de diferentes parâmetros. Portanto, tempo e eficiência da solubilização precisam ser estudados e priorizados no desenvolvimento de cada específico processo.

### PARTE III

*Considerações Finais*

---

## CAPÍTULO 8 – Conclusões, Desafios Futuros e Produção Científica

---

No capítulo 8 serão apresentadas as conclusões obtidas após os resultados experimentais alcançados, bem como da revisão da literatura sobre o tema. Além disso, serão descritas as principais produções científicas e os trabalhos realizados em parcerias durante a execução da tese.

### 8.1 CONCLUSÃO

São inúmeras as possíveis combinações entre doadores e receptores de hidrogênio para o preparo dos DES (do inglês – *deep eutectic solvent*), sendo dessa forma, considerados como solventes *designers*. Durante o processo de extração dos compostos bioativos presentes no rizoma, folha e flor da *Curcuma longa* L., cinco diferentes DES's foram preparados e empregados como agentes extratores e a técnica de extração assistida por ultrassom foi utilizada. Dos cinco DES's dois eram hidrofílicos, compostos por cloreto de colina e ácido láctico e cloreto de colina e ácido acético, e três hidrofóbicos, preparados a base de Mentol + Ácido Láctico e Mentol + Ácido Acético. O etanol foi utilizado como solvente de comparação devido a sua ampla utilização na extração de compostos bioativos.

Durante a seleção do solvente, tempo e temperatura de extração, foram realizadas nos extratos obtidos as análises de DPPH, FRAP e flavonoides totais. Como já era esperado, devido as características dos compostos bioativos e dos solventes empregados, os dois DES hidrofóbicos (mentol + ácido láctico e mentol + ácido acético) apresentaram as melhores performances, sendo então selecionados para as etapas seguintes. O etanol, por sua vez, apresentou menor capacidade de extração de compostos bioativos, quando comparado aos DES empregados. Tendo em vista as dificuldades durante os processos de extração, principalmente em função dos solventes convencionalmente empregados apresentarem certa toxicidade, a utilização dos DES pode auxiliar a minimizar a influência humana na degradação do meio ambiente.

Além dos solventes, foram selecionadas a temperatura de 45 °C e tempos de 2 até 3 horas como parâmetros do processo. A partir dos extratos e solventes selecionados, foram realizadas algumas análises para testar as suas possíveis atividades biológicas. Essas análises foram: capacidade antioxidante; flavonoides

totais; ação antimicrobiana; quelação do íon de Ferro<sup>2+</sup>; efeito inibitório nas atividades das enzimas hidrolisantes ( $\alpha$ -amilase) e colinesterases. Em todas as amostras foram encontrados resultados satisfatórios de diferentes bioatividades. Além disso, os extratos e os DES mostraram-se atóxicos às células de *Allium cepa* L.. Estes fatos indicam a possibilidade e a potencialidade de aplicação dessas amostras em produtos destinados ao consumo humano.

Os DES e extratos selecionados mostraram alta capacidade de inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase pancreática suína e salivar humana. No entanto, os extratos obtidos com o DES mentol e ácido acético apresentaram uma menor capacidade de inibição, quando comparado ao DES mentol e ácido láctico. Para melhor compreensão quanto a interação entre a enzima  $\alpha$ -amilase pancreática suína e a curcumina e os dois DES a base de mentol ácidos láctico e acético, estes foram submetidos a análises de fluorescência, dicroísmo circular (DC), calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e *docking* molecular.

As análises de fluorescência e DC mostraram que não houve desnaturação da estrutura da  $\alpha$ -amilase, tanto na presença da curcumina quanto do extrato e DES. A análise do ITC mostrou que na presença da curcumina e do extrato houve uma menor taxa de reação, relacionada à inibição da atividade da enzima. A inibição foi não competitiva, uma vez que nenhuma diferença significativa foi obtida para a constante de Michalis-Menten. O *docking* molecular mostrou que a curcumina é o composto com maior probabilidade de se ligar ao sítio ativo da  $\alpha$ -amilase em comparação com o mentol e o ácido láctico. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a curcumina e o extrato apresentam grande potencial para serem utilizados como potenciais inibidores da  $\alpha$ -amilase, podendo ser aplicados pela indústria farmacêutica e alimentícia para inibir a hidrólise do amido no corpo humano.

A solubilidade de biomoléculas (curcumina, quercetina, ácido gálico e cafeína), foi avaliada em soluções aquosas e aditivos compostos por DES e seus constituintes (cloreto de colina, xilitol, 1,2-propanodiol e etileno glicol). Os aditivos aumentaram a solubilidade da curcumina e quercetina em água, mesmo estas apresentando características de hidrofobicidade. A adição do cloreto de colina em água causou efeito hidrótrofo na solubilidade de ácido gálico. Todos os aditivos aplicados, causaram uma redução da solubilidade da cafeína comparada a capacidade de solubilização da água pura.

Estes resultados demonstram que alguns aditivos podem ser aplicados com finalidade de aumentar a solubilidade de compostos que possuem baixa afinidade com a água. O efeito hidrótopo também é interessante em escala industrial, uma vez que, pode-se controlar o aumento e redução de solubilidade, de acordo com a concentração do aditivo. Os modelos tipo COSMO auxiliaram na compreensão da interação entre essas moléculas, sendo capaz de prever até o efeito hidrótopo causado no ácido gálico.

## 8.2 DESAFIOS FUTUROS

Espera-se que esse trabalho auxilie na melhor compreensão de interação dos DES com os compostos de interesse, bem como fomenta a aplicação desses solventes para extração de compostos com alto potencial de aplicabilidade em produtos destinados ao consumo humano. Devido as diversas bioatividades e a não toxicidade apresentadas tanto nos DES puros, quanto nos extratos, percebe-se a ampla capacidade destes em serem incorporados em produtos alimentícios, fármacos e cosméticos a fim de promover a saudabilidade.

Testes prévios mostraram a possibilidade de incorporação dos extratos hidrofóbicos em balas de gelatina. Como o DES utilizado é composto por mentol, seria interessante o estudo para viabilidade de aplicação desses extratos em gomas de mascar, sabor laranja, por exemplo, uma vez que as amostras apresentam coloração alaranjada. Há uma grande gama de possibilidade de aplicação desses extratos em produtos destinados ao consumo humano, contudo, análises posteriores de manutenção das atividades bioativas são necessárias.

Do ponto de vista de interação entre essas moléculas, há muito a ser explorado. Até o presente momento, não é encontrado na literatura uma convergência de resultados para explicar e prever o efeito de hidrotropia, por exemplo. Os modelos tipo COSMO se mostram alternativas interessantes no auxílio destas compreensões, além de serem vantajosos, pois podem reduzir análises experimentais, bem como o uso de produtos de alto valor agregado.

### 8.3 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

#### Artigos Publicados em Periódicos

OLIVEIRA, G.; WOJEICCHOWSKI, J. P.; FARIAS, F. O.; IGARASHI-MAFRA, L.; SOARES, R. D. P.; MAFRA, M. R. Enhancement of biomolecules solubility in aqueous media using designer solvents as additives: an experimental and COSMO-based models' approach. **Journal of Molecular Liquids**. v. 318, 2020. **DOI:** 10.1016/j.molliq.2020.114266. **JCR:** 5,065; **Qualis:** B3.

OLIVEIRA, G.; MARQUES, C.; OLIVEIRA, A.; SANTOS, A. A.; AMARAL, W. INEU, R. P.; LEIMANN; F. V.; PERON, A. P.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R. Extraction of bioactive compounds from *Curcuma longa* L. using deep eutectic solvents: In vitro and in vivo biological activities. **Innovative Food Science Emerging Technology**, v. 70, 102697, 2021. **DOI:** 10.1016/j.ifset.2021.102697. **JCR:** 5,916. **Qualis:** A1.

OLIVEIRA, G.; FARIAS, F. O.; SOSA, F. H. B.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R. Green solvents to tune the biomolecules' solubilization in aqueous media: An experimental and in silico approach by COSMO-RS. **Journal of Molecular Liquids**. v. 341, 2021. **DOI:** 10.1016/j.molliq.2021.117314. **JCR:** 5,065; **Qualis:** B3.

OLIVEIRA, G.; BONASSOLI, A. B.G.; ROLEMBERG, M. P.; MOTA, M. A.; BASSO, R. C.; SOARES, R. D. P.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R. Water Effect on Solubilities of Lauric and Palmitic Acids in Ethanol and 2-Propanol Determined by Differential Scanning Calorimetry. **Journal of Chemical Engineering Data**, v. 66, p. 2366–2373, 2021. **DOI:** 10.1021/acs.jced.0c00805. **JCR:** 2,694. **Qualis:** B5.

FARIAS, F. O.; OLIVEIRA, G.; LEAL, F. C.; WOJEICCHOWSKI, J. P.; YAMAMOTO, C. I.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R. Cholinium chloride effect on ethanol-based aqueous biphasic systems: Liquid-liquid equilibrium and biomolecules partition behavior. **Fluid Phase Equilibria**, v. 505, 112363, 2020. **DOI:** 10.1016/j.fluid.2019.112363. **JCR:** 2,838. **Qualis:** A2.

MARQUES, C.; SOTILES, A. R.; FARIAS, F. O.; OLIVEIRA, G.; MITTERER-DALTOÉ, M. L.; MASSON, M. L. Full physicochemical characterization of malic acid: Emphasis in the potential as food ingredient and application in pectin gels. **Arabian Journal of Chemistry**, v, 13, p. 9118–9129, 2020. DOI: 10.1016/j.arabjc.2020.10.036. JCR: 4,920. Qualis: A1.

TOAZZA, C. E. B.; LEAL, F. C.; MARQUES, C.; OLIVEIRA, G.; FARIAS, F. O.; BELAN, A. L. D.; LEITE, N. F.; MAFRA, M. R.; IGARASHI-MAFRA, L.; MASON, M. L. Bioactive compounds extraction from different lemongrass species: Strategies and deep eutectic solvents evaluation. **Food Process Engineering**, p. 1–14, 2022. DOI: 10.1111/jfpe.14033. JCR: 2,356. Qualis: B2.

#### **Participação em Capítulo de Livro**

OLIVEIRA, G.; WOJECCHOWSKI, J. P.; FARIAS, F. O.; MAFRA, M. R.; IGARASHI-MAFRA, L. From Biocompatibility to Challenges: A Complete View of Deep Eutectic Solvents (DES) Boosting Extraction Process. **Deep Eutectic Solvents: Properties, Application and Toxicity**. INC, New York, Nova Science publisher, p. 105-126, 2022.

#### **Participação em Eventos**

**X-Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada: participação e apresentação de trabalho.** OLIVEIRA, G.; DIAS, M. C. G. C.; LEAL, F. C.; FARIAS, F. O.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R. Biomolecules solubility in cholinium chloride aqueous solutions at 298.15 K, 2019. CBTermo, 2019.

**X-Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada: participação e apresentação de trabalho.** DIAS, M. C. G. C.; OLIVEIRA, G.; COSTA, M. C.; IGARASHI-MAFRA, LUCIANA; MAFRA, M. R. Density and viscosity of deep eutectic solvent composed by cholinium chloride and sorbose. CBTermo, 2019.

**X-Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada: participação e apresentação de trabalho.** LEAL, F. C.; FARIAS, F. O.; OLIVEIRA, G.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R. Obtain of bioactive compounds from soursop leaves (*Annona muricata* L.) with deep eutectic solvents by ultrasound-assisted extraction waves, 2019. CBTermo, 2019.

**International Meeting on Deep Eutectic Systems: University of Lisbon.** DIAS, M. C. G. C.; OLIVEIRA, G.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R. Transition State Theory applied to DES (ChCl + 1,2-Propanodiol) and its aqueous solution.

**23º Congresso Brasileiro de Engenharia Química.** OLIVEIRA, G.; WOJEICCHOWISKI, J. P.; FARIAS, F. O.; MAFRA, M. R ; IGARASHI-MAFRA, L. Green solvents as alternative route to change quercetin' solubility: experimental and COSMO-RS approach. COBEQ, 2021.

## REFERÊNCIAS

- ABBASI, M. A.; ILYAS, M.; AZIZ-UR-REHMAN, SONIA, A.; SHAHWAR, D.; RAZA, M. A.; KHAN, K. M.; ASHRAF, M.; AFZAL, I.; AMBREEN, N. Curcumin and its derivatives: Moderate inhibitors of acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and trypsin. **Sci. Iran.** 19, 1580–1583, 2012.
- ABBOTT, A. P.; BOOTHBY, D.; CAPPER, G.; DAVIES, D. L.; RASHEED, R. K. Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. **Journal of the American Chemical Society, Washington**, v. 126, n. 29, p. 9142-9147, 2004.
- ABBOTT, A. P.; CAPPER, G.; DAVIES, D. L.; RASHEED, R. K.; TAMBYRAJAH, V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. **Chemical Communications**, p. 70-71, 2003.
- ABRANCHES, D.O.; BENFICA, J.; SOARES, B. P.; LEAL-DUASO, A.; SINTRA, T. E.; PIRES, E.; PINHO, S. P.; SHIMIZU, S.; COUTINHO, J. A. P. Unveiling the mechanism of hydrotrophy: Evidence for water-mediated aggregation of hydrotropes around the solute. **Chem. Commun.**, v. 56, p. 7143–7146, 2020.
- ABRANCHES, D.O.; LARRIBA, M.; SILVA, L.P.; MELLE-FRANCO, M.; PALOMAR, J.F.; PINHO, S.P.; COUTINHO, J.A.P. Using COSMO-RS to design choline chloride pharmaceutical eutectic solvents. **Fluid Phase Equilib.** v. 497, p. 71–78, 2019.
- AHMADI, R.; HEMMATEENEJAD, B.; SAFAVI, A.; SHOJAEIFARD, Z.; MOHABBATI, M.; FIRUZI, O. Assessment of cytotoxicity of choline chloride-based natural deep eutectic solvents against human HEK-293 cells: A QSAR analysis. **Chemosphere.** v. 209, p. 831–838, 2018.
- AK, T.; GÜLÇİN, I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chem. Biol. Interact.**, v. 174, p. 27–37, 2008.
- ALANÓN, M. E.; IVANOVIĆ, M.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A. Choline chloride derivative-based deep eutectic liquids as novel green alternative solvents for extraction of phenolic compounds from olive leaf. **Arab. J. Chem.** p. 1685–1701, 2020.
- ALMEIDA, M. C.; SAMPAIO, G. R.; BASTOS, D. H. M.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H. Evaluation of the antioxidant properties of curcumin derivatives by genetic function algorithm. **Radiation Physics and Chemistry.** v. 152, p. 12-16, 2018.
- AL-QASSABI, J. S. A.; WELI, A. M.; HOSSAIN, M. A. Comparison of total phenols content and antioxidant potential of peel extracts of local and imported lemons samples. **Sustainable Chemistry and Pharmacy.** v. 8, p. 71-75, 2018.
- ALTUNAY; N.; ELIK, A.; GÜRKA, R. Preparation and application of alcohol based deep eutectic solvents for extraction of curcumin in food samples prior to its spectrophotometric determination. **Food Chemistry.** v. 310, 125933, 2020.
- ANDRES, S.; PEVNY, R.; ZIEGENHAGEN, N.; BAKHIYA, B.; SCH, K. I.; HIRSCH-ERNST, A. Lampen, Safety Aspects of the Use of Quercetin as a Dietary Supplement

Safety Aspects of the Use of Quercetin as a Dietary Supplement. **Mol. Nutr. Food Res.** 62 (1), 2017.

ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetylcholinesterase - AChE: A pharmacological interesting enzyme. **Rev. Virtual Quim.** v. 8, p. 1818–1834, 2016.

ASAI, A.; NAKAGAWA, K.; MIYAZAWA, T. Antioxidative effects of turmeric, rosemary and capsicum extracts on membrane phospholipid peroxidation and liver lipid metabolism in mice. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 63, p. 2118–2122, 1999.

AUNE, D.; KEUM, N.; GIOVANNUCCI, E. Dietary intake and blood concentrations of antioxidants and the risk of cardiovascular disease, total cancer, and all-cause mortality: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. **Am J Clin Nutr.**; v. 108, p. 1069–1091, 2018.

AYDIN, F.; YILMAZ, E.; SOYLAK, M. Vortex assisted deep eutectic solvent (DES)-emulsification liquid-liquid microextraction of trace curcumin in food and herbal tea samples. **Food Chemistry**, v. 243, p. 442–447, 2018.

BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **RSC Advances**. v. 5, p. 27540–27557, 2015.

BELUSSO, A. C. ; STRACK, M. L. ; GUADAGNIN, L. S. ; FACCIN, D. J. L. ; CARDOZO, N. S. M. ; SOARES, R. D. P. ; STAUDT, P. B. Infinite dilution activity coefficient of solvents in poly-3-hydroxybutyrate from inverse gas chromatography. **Fluid Phase Equilibria**. v. 553, 112742, 2020.

BERNI, R. F.; CHAVES, F. C. M.; PINHEIRO, J. B.; VAZ, A. P. A. Produção de açafraão em função de acessos e do peso de rizomas-semente. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v. 16, p. 765–770, 2014.

BONILLA, J.; VARGAS, F.; OLIVEIRA, T. Recent Patents on the applications of bioactive compounds in food: A short review. **Current Opinion in Food Science**. v. 5, p. 1–7, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72(1–2), p. 248–254, 1976.

BRAGA, M.E.M.; LEAL, P.F.; CARVALHO, J.E.; M. MEIRELES, A.A. Comparison of Yield, composition, and Antioxidant Activity of Turmeric (*Curcuma longa L.*) Extracts obtained Using Various Techniques. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 51, p. 6604–6611, 2003.

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. 25–1730, 1995.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods Mode of action and microbial resistance mechanisms. **Int. J. Food Microbiol.** 50, 1–17, 1999.

CALVIELLO, G. et al. DNA Damage and Apoptosis Induction by the Pesticide Mancozeb in Rat Cells: Involvement of the Oxidative Mechanism. **JANO, Rome**, v. 63, n. 14, p. 39 – 46, July 2005.

CAO, J.; CHEN, L.; LI, M.; CAO, F.; ZHAO, L.; SU, E. Efficient extraction of proanthocyanidin from *Ginkgo biloba* leaves employing rationally designed deep eutectic solvent-water mixture and evaluation of the antioxidant activity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 158, p. 317–326, 2018.

CÁRCEL, J. A.; PÉREZ, J. V. G.; BENEDITO, J.; MULET, A. Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 200–207, 2012.

CASTRO, M. D. L.; PRIEGO-CAPOTE, F.; PERALBO-MOLINA, A. The role of ultrasound in analytical derivatizations. **Journal of Chromatography B**, v. 897, p. 1189–1195, 2011.

CECÍLIO FILHO, A. B.; SOUZA, R. J.; BRAZ, L. T.; TAVARES, M. *Curcuma*: Planta Medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, p. 171–175, 2000.

CHANDRAN, D.; KHALIDA, M.; WALVEKAR, R.; MUBARAK, N. M.; DHARASKARD, S.; WONGE, W. Y.; GUPTA, T. C. S. M. Deep eutectic solvents for extraction-desulphurization: A review. **Journal of Molecular Liquids**, v. 275, p. 312–322, 2019.

CHATTOPADHYAY, I. et al. Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. **Current Science**, v. 87, n. 1, 2004.

CHEMAT, F.; HUMA, Z.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonic Sonochemistry**, v. 18, p. 813–835, 2011.

CHEN, X.; FADDA, H. M.; ABURUB, A.; MISHRA, D.; PINAL, R. Cosolvency approach for assessing the solubility of drugs in poly (vinylpyrrolidone). **Int. J. Pharm.** v. 494, p. 346–356, 2015.

CLÁUDIO, A. F. M.; NEVES, M. C.; SHIMIZU, K.; CANONGIA LOPES, J. N.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. P. The magic of aqueous solutions of ionic liquids: ionic liquids as a powerful class of cationic hydrotropes. **Green Chem.** v. 17, p. 3948–3963, 2015.

CLSI, DOLINSKY, A.L.; OHIRO, R.K.; FAN, W.; XIAO, C.; WU, F. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Document M100–S10., 27th ed, **Journal of International Medical Research**. USA, 2017.

CRAMPON, K.; GIORKALLOS, A.; DELDOSSI, M.; BAUD, S.; ANGELO STEFFENEL, L. Machine-learning methods for ligand–protein molecular docking. **Drug Discovery Today**, 2021.

- CUJIC, N.; ŠAVIKIN, K.; JANKOVIC, T.; PLJEVLJAKUSIC, D.; ZDUNIC, G. IBRIC, S. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. **Food Chemistry**, v. 194, p. 135–142, 2016.
- CUNHA, F. A. B.; PINHO, A. I.; SANTOS, J. F. S.; SOBRAL-SOUZA, C. E.; ALBUQUERQUE, R. S.; MATIAS, E. F. F.; COSTA, G. M.; BOLIGON, A. A.; LEITE, N. F.; TINTINO, S. R.; WACZUK, E. P. Cytoprotective effect of *Eugenia uniflora* L. against the waste contaminant mercury chloride. **Arabian Journal of Chemistry**, 4197–4203, 2019.
- CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O. Extraction techniques with deep eutectic solvents. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 105, p. 225-239, 2018.
- D'AMICO, A. G. D.; SACCONI, S.; BUCOLO, C.; MAUGERI, G.; RASÀ, D.; LAZZARA, F.; FIDILIO, A.; AGATA, V. D. Modulates hyperglycemic – inflammatory event of diabetic retina by counteracting outer blood retinal barrier damage. **Original Research Article**, 5230–5240, 2019.
- DA SILVA, S. M.; KOEHNLEIN, E. A.; BRACHT, A.; CASTOLDI, R.; MORAIS, G. R.; BAESSO, M. L.; PERALTA, R. A.; SOUZA, C. G. M.; SÁ-NAKANISHI, A. B.; PERALTA, R. M. Inhibition of salivary and pancreatic  $\alpha$ -amylases by a pinhão coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. **Food Research International**, v. 56, p. 1–8, 2014.
- DAI, Y. Natural Deep Eutectic Solvents and their application in natural product research and development. 2013. 193f. Tese – **Universiteit Leiden**. 2013a.
- DAI, Y.; SPRONSEN, J. V.; WITKAMP, G. J.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Natural Deep Eutectic Solvents as new potential media for green technology. **Analytica Chimica Acta**, v. 766, p. 61-68, 2013.
- DAI, Y.; WITKAMP, G.J.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y.H. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. **Food Chem.** v. 187, p. 14–19, 2015.
- DALLAKYAN, S.; OLSON, A. Participation in global governance: Coordinating “the voices of those most affected by food insecurity.” **Global Food Security Governance**, v. 1263, p. 1–11, 2015.
- DALLEGRAVE, E. Toxicologia Clínica: Aspectos Teórico-Práticos. Porto Alegre: UFRGS, p. 44–61, 2006.
- DAMMAK, M. I.; CHAKROUN, I.; MZOUGH, Z.; AMAMOU, S.; MANSOUR, H. B.; CERF, D. L.; MAJDOUB, H. Characterization of polysaccharides from *Prunus amygdalus* peels: Antioxidant and antiproliferative activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 198–206, 2018.
- DELGADO-MELLADO, N.; LARRIBA, M.; NAVARRO, P.; RIGUAL, V.; AYUSO, M.; GARCÍA, J.; RODRÍGUEZ, F. Thermal stability of choline chloride deep eutectic solvents by TGA/FTIR-ATR analysis. **Journal of Molecular Liquids**, v. 260, p. 37-43, 2018.

- DERAKHSHAN, Z.; FERRANTE, M.; TADI, M.; ANSARI, F.; HEYDARI, A.; HOSSEINI, M. S.; CONTI, G. O.; SADRABAD, E. K. Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds. **Food and Chemical Toxicology**. v. 114, p. 108-111, 2018.
- DEVATKAL, S. K.; NARSAIAH, K.; BORAH, A. Anti-oxidant effect of extracts of kinnow rind, pomegranate rind and seed powders in cooked gat patties. **Meat Science**. v. 85, p. 155-159, 2010.
- DHITAL, S.; GIDLEY, M. J.; WARREN, F. J. Inhibition of  $\alpha$ -amylase activity by cellulose: Kinetic analysis and nutritional implications. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 305–312, 2015.
- DIAS, R. M.; PETRIN, L. C. G.; SOSA, F. H. B.; DA COSTA LOPES, A. M.; COUTINHO, J. A. P.; DA COSTA, M. C. Investigation of Kraft Lignin Solubility in Protic Ionic Liquids and Their Aqueous Solutions. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 59, p. 18193–18202, 2020.
- DING, H.; WU, X.; PAN, J.; HU, X.; GONG, D.; ZHANG, G. New Insights into the Inhibition Mechanism of Betulinic Acid on  $\alpha$ -Glucosidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 7065–7075, 2018.
- DOHI, S.; TERASAKI, M.; MAKUNO, M. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity and Chemical Composition of Commercial Essential Oils. **J. Agric. Food Chemistry**. v. 57, p. 4313–4318, 2009.
- DUARTE, G. B. S.; REIS, B. Z. Alimentos funcionais e compostos bioativos: ciência, avaliação e consumo. **ILSI International Life Sciences Institutes of Brasil**. v. 10, SP-São Paulo, 2019.
- DUBAL, Z. B.; PATURKAR, A. M.; WASKAR, V. S.; ZENDE, R. J.; LATHA, C.; RAWOOL, D. B.; KADAM, M. M. Effect of food grade organic acids on inoculated *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Typhimurium* in sheep/goat meat stored at refrigeration temperature. **Meat Sci**. 66, 817–821, 2004.
- DURAI SWAMY, A. et al. Development of an antidiabetic formulation (ADJ6) and its inhibitory activity against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 6, n. 3, p. 204–208, 2016.
- ECKERT, F.; KLAMT, A. Fast solvent screening via quantum chemistry: COSMO-RS approach. **AIChE J**. v. 48, p. 369–385, 2002.
- EISENTHAL, R.; DANSON, M. J.; HOUGH, D. W. Catalytic efficiency and  $k_{cat}/K_M$ : a useful comparator? **Trends in Biotechnology**, v. 25(6), p. 247–249, 2007.
- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K.D.; VALENTINO, A. Jr.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric of acetylcholinesterase determination. **Biochemical Pharmacology**. v. 7, p. 88–95, 1961.
- FARKAS, F. K. The industrial paint-making process, Second Edi. **Woodhead Publishing Ltd**, 1999.

FELLOWS, P. J. Food processing technology: Principles and Practice. Cambridge: **Woodhead Publishing Ltda.** Third Edition. 912 p., 2009.

FERRARINI, F.; FL, G. B.; MUNIZ, A. R.; SOARES, R. D. P.; May, P. An Open and Extensible Sigma-Profile Database for COSMO-Based Models. v. 64, 2018.

FIGUEIREDO, A. J. P. Solubilidade do hidrogeno ftalato de potássio nos sistemas (KHf<sub>t</sub>+H<sub>2</sub>O) e (KHf<sub>t</sub>+HCl+H<sub>2</sub>O) no intervalo de temperatura 5-60 °C. Universidade da Beira Interior, **Covilhã**, 2004.

FISKESJO, G. The Allium test – a potential standard for the assessment of enviromental toxicity. In: J. W. Gorsuch (ed.), ASTM (American Society of testing Materials) special technical publication 1216. **Environ. Toxicol. Risk Assessment.**, p. 331–345, 1993.

FOURMENTIN, T. EL, S.; GREIGE-GERGES, H. Deep eutectic solvents : An overview on their interactions with water and biochemical compounds. **J. Mol. Liq.** v. 288, 2019.

FUJISAWA, T.; IKEGAMI, H.; INOUE, K.; KAWABATA, Y.; OGIHARA, T. Effect of two  $\alpha$ -glucosidase inhibitors, voglibose and acarbose, on postprandial hyperglycemia correlates with subjective abdominal symptoms. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 54(3), p. 387–390, 2005.

GAYNANOVA, G. A.; VALEEVA, F. G.; KUSHNAZAROVA, R. A.; BEKMUKHAMETOVA, A. M.; ZAKHAROV, S. V. Effect of Hydrotropic Compounds on the Self-Organization and Solubilization Properties of Cationic Surfactants. **Physical Chemistry of Surface Phenomena**. v. 92, p. 1400–1405, 2018.

GELMEZ, N.; KINCAL, N. S.; YENER, M. E. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from roasted wheat germ based on yield, total phenolic and tocopherol contents, and antioxidant activities of the extracts. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 48, n. 3, p. 217–224, 2009.

GERBER, R. P.; SOARES, R. D. P. Prediction of infinite-dilution activity coefficients using UNIFAC and COSMO-SAC variants. **Ind. Eng. Chem. Res.** 49, 7488–7496, 2010.

GHAYOUR, N.; MOHAMMAD, S.; HOSSEINI, H.; HADI, M. Food Hydrocolloids Nanoencapsulation of quercetin and curcumin in casein-based delivery systems. **Food Hydrocoll.** v. 87, p. 394–403, 2019.

GOVINDARAJAN, V.S. Turmeric - chemistry, technology and quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 12, n. 3, p. 199–201, 1980.

GRUBER, D.; TOPPHOFF, M.; GMEHLING, J. Measurement of activity coefficients at infinite dilution using gas–liquid chromatography. 9. results for various solutes with the stationary phases 2-pyrrolidone and n -methylformamide. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 43, n. 6, p. 935–940, 1998.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of caffeic acid 3, 4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**. v. 217, p. 213–220, 2006.

GUPTA, S. C., KISMALI, G., & AGGARWAL, B. B. Curcumin, a component of turmeric: From farm to pharmacy. **Bio Factors**, v. 39, n. 1, p. 2–13, 2013.

HAMMOND, P. S.; BOWRON, D.T.; EDLER, K.J. Deep Eutectic Solvents Very Important Paper The Effect of Water upon Deep Eutectic Solvent Nanostructure : An Unusual Transition from Ionic Mixture to Aqueous Solution *Angewandte*. p. 9782–9785, 2017.

HAMMOND, P. S.; FORSTER, J. S. A Microassay-Based Procedure for Measuring Low Levels of Toxic Organophosphorus Compounds through Acetylcholinesterase Inhibition. **Analytical**, 3, 380–383, 1989.

HAYYAN, M., ALI, M., AL-SAADY, M. A., HAYYAN, A., ALNASHEF, I. M., & MIRGHANI, M. E. S. Chemosphere Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. **Chemosphere**, v. 93, p. 455–459, 2013.

HERRERO, O.; PÉREZ MARTÍN, J. M.; FERNÁNDEZ FREIRE, P.; CARVAJAL LÓPEZ, L.; PEROPADRE, A.; HAZEN, M. J. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 743, 20–24, 2012.

HORST, M.A.; CRUZ, A.C.; LAJOLO, F.M. Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos. In: COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 5ª ed. São Paulo (Barueri): Editora Manole. p. 949-987, 2016.

IMPERATO, G.; HÖGER, S.; LENOIR, D.; KÖNIG, B. Low melting sugar-urea-salt mixtures as solvents for organic reactions – estimation of polarity and use in catalysis. **Green Chemistry**, v. 8, p. 1051-1055, 2006.

IQBAL, R.; MEHMOOD, Z.; BAIG, A.; KHALID, N. Formulation and characterization of food grade O/W nanoemulsions encapsulating quercetin and curcumin: Insights on enhancing solubility, characteristics. **Food Bioprod. Process.** v. 123, p. 304–311, 2016.

JAYAPRAKASHA, G. K.; JAGANMOHAN RAO, L.; SAKARIAH, K. K. Chemistry and biological activities of *Curcuma longa*. **Trends in Food Science e Technology**, London, v. 16, n. 12, p. 533-548, 2005.

JERMAN, T.; TREBSE, P.; MOZETIC, V. B. Ultrasound-assisted solid-liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 123, p. 175-182, 2010.

JIANG, Z.; YUAN, J.; WANG, P.; FAN, X.; XU, J.; WANG, Q.; ZHANG, L. Dissolution and regeneration of wool keratin in the deep eutectic solvent of choline chloride-urea. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 423-430, 2018.

KAESWURM, J. A. H.; KÖNIGHOFER, L.; HOGG, M.; SCHARINGER, A.; BUCHWEITZ, M. Impact of B-Ring Substitution and Acylation with Hydroxy Cinnamic Acids on the Inhibition of Porcine. **Foods**, v. 9, p. 367, 2020.

KATO, C. G.; DE ALMEIDA GONÇALVES, G.; PERALTA, R. A.; SEIXAS, F. A. V.; DE SÁ-NAKANISHI, A. B.; BRACHT, L.; COMAR, J. F.; BRACHT, A.; PERALTA, R.

M. Inhibition of  $\alpha$ -Amylases by Condensed and Hydrolysable Tannins: Focus on Kinetics and Hypoglycemic Actions. **Enzyme Research**, p. 1–12, 2017.

KATO-SCHWARTZ, C. G.; CORRÊA, R. C. G.; DE SOUZA LIMA, D.; DE SÁ-NAKANISHI, A. B.; DE ALMEIDA GONÇALVES, G.; SEIXAS, F. A. V.; HAMINIUK, C. W. I.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Potential anti-diabetic properties of Merlot grape pomace extract: An in vitro, in silico and in vivo study of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibition. **Food Research International**, v. 137, 109462, 2020.

KLAMT, A.; ECKERT, F.; ARLT, W., COSMO-RS: An Alternative to Simulation for Calculating Thermodynamic Properties of Liquid Mixtures, **Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.** v. 1, 2010.

KNUDSEN, J. G.; HAMILTON, A.; RAMRACHEYA, R.; ASHCROFT, F. M.; ADAM, J.; K; TARASOV, A. I.; BRERETON, M.; MULDER, H.; ZHANG, Q.; ASHCROFT, F. M. Dysregulation of Glucagon Secretion by Article Dysregulation of Glucagon Secretion by Hyperglycemia-Induced Sodium-Dependent Reduction of ATP Production. **Cell Metabolism**, 29, 1–13, 2019.

KOOP, Heidegrid Siebert. Hidrogéis binários de xantana e galactomananas com incorporação de curcumina visando uso tópico. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 142 f., 2012.

KROON, M.C.; FRANCISCO, M.; VAN DEN BRUINHORST, A.; KROON, M.C Low-Transition-Temperature Mixtures ( LTTMs ): A New Generation of Designer Solvents. **A Journal of the German Chemistry Society**. p. 3074–3085, 2013.

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

KULKARNI, V .M.; RATHOD, V. K. Extraction of mangiferin from *Mangifera indica* leaves using three phase partitioning coupled with ultrasound. **Ind. Crop. Prod.** 52, 292–297, 2014.

LADOLE, M. R.; NAIR, R. R.; BHUTADA, Y. D.; AMRITKAR, V. D. Ultrasonics - Sonochemistry Synergistic effect of ultrasonication and co-immobilized enzymes on tomato peels for lycopene extraction. **Ultrason. – Sonochemistry**. 48, 453–462, 2018.

LEE, J. H., & CHOUNG, M. G. Determination of curcuminoid colouring principles in commercial foods by HPLC. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1217–1222, 2011.

LI, N.; WANG, Y.; XU, K.; HUANG, Y.; WEN, Q.; DING, X. Development of green betaine-based deep eutectic solvent aqueous two-phase system for the extraction of protein. **Talanta**, v. 152, p. 23-32, 2016.

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

- LIU, Y.; LI, J.; FU, R.; ZHANG, L.; WANG, D.; WANG, S. Enhanced extraction of natural pigments from *Curcuma longa* L. using natural deep eutectic solvents. **Ind. Crop. Prod.** 140, 111620, 2019.
- MACÁRIO, I. P. E.; OLIVEIRA, H.; MENEZES, A. C.; VENTURA, S. P. M.; PEREIRA, J. L.; GONÇALVES, A. M. M.; COUTINHO, J. A. P.; GONÇALVES, F. J. M. Cytotoxicity profiling of deep eutectic solvents to human skin cells. **Scientific Reports.** 9, 32, 2019.
- MACFARLANE, D. R.; TACHIKAWA, N.; FORSYTH, M. PRINGLE, J. M.; HOWLETT, P. C.; ELLIOTT, G. D.; DAVIS, J. H.; WATANABE, M.; SIMON, P.; ALGELL, C. A. Energy applications of ionic liquids, **Energy & Environmental Science**, v. 7, p. 232–250, 2014.
- MAHESHWARI, R. K.; SINGH, A. K.; GADDIPATI, J.; SRIMAL, R. C. Multiple biological activities of curcumin : A short review. **Life Sci.** v. 78, p. 2081–2087, 2006.
- MANDAL, V.; DEWANJEE, S.; SAHU, R.; MANDAL, S. C. Design and Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Curcumin as an Effective Alternative for Conventional. **Nat. Prod. Commun.** 4, 95–100, 2009.
- MANOLOVA, Y.; DENEVA, V.; ANTONOV, L.; DRAKALSKA, E.; MOMEKOVA, D. Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy The effect of the water on the curcumin tautomerism : A quantitative approach. Spectrochim. **ACTA PART A Mol. Biomol. Spectrosc.** 132, 815–820, 2014.
- MANSUR, C.R.E.; SPINELLI, L.S.; LUCAS, E.F.; GONZÁLEZ, G. The influence of a hydrotropic agent in the properties of aqueous solutions containing poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) surfactants. **Colloids Surfaces a Physicochem. Eng. Asp.** v. 149, 1999.
- MARTINS, M. A. R.; PINHO, S. P.; COUTINHO, J. A. P. Insights into the Nature of Eutectic and Deep Eutectic Mixtures. **Journal of Solution Chemistry**, p. 1-21, 2018.
- MAZZUCHELLI, C. et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: A patient-centered approach. Update to a position statement of the American diabetes association and the European association for the study of diabetes. **Diabetes Care**, v. 38, n. 8, p. 140–149, 2015.
- MAZZUTTI, S. Extração de compostos com importância biológica provenientes de *Plantago major* e *Plantago lanceolata* através de técnicas ambientalmente seguras. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Centro Tecnológico, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 168 f., 2016.
- MEDEIROS, M. L. Extrato de Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Um antioxidante eficiente para uso no biodiesel. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 75 f., 2013.
- MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, 412, 407–412, 1993.

MIQUEL, J., BERND, A., SEMPERE, J. M., DIAZ-ALPERI, J., & RAMIREZ, A. The curcuma antioxidants: Pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 34, p. 37–46, 2002.

MIRJAFARI, A. Ionic liquid syntheses via click chemistry: expeditious routes toward versatile functional materials, **Chemical Communications**, v. 54, p. 2944–2961, 2018.

MOREIRA, T. F. M.; PESSOA, L. G. A.; SEIXAS, F. A. V.; INEU, R. P.; GONÇALVES, O. H.; LEIMANN, F. V.; RIBEIRO, R. P. Chemometric evaluation of enzymatic hydrolysis in the production of fish protein hydrolysates with acetylcholinesterase inhibitory activity. **Food Chemistry**, v. 367, 2022.

MORRIS, M.; GARRETT; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSSELL, D. S.; OLSON, A. J. Software News and Updates Gabedit — A Graphical User Interface for Computational Chemistry Softwares. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, p. 174–182, 2009.

MUHAMMAD, N. S.; KAUSAR, T.; JABBAR, S.; MUMTAZ, A.; AHAD, K.; SADDZOAI, A. A. Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. **Journal of Food and Drug Analysis**. V.25, p. 488-500, 2017.

MULLIN, J. W. Crystallization. Butterworth Heinemann, terceira edição, Oxford, 1993.

NELSON, K. M.; DAHLIN, J. L.; BISSON, J.; GRAHAM, J.; PAULI, G. F.; WALTERS, M. A. The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. **J. Med. Chem.** 60, 1620–1637, 2017.

NULWALA, H.; MIRJAFARI, A.; ZHOU, X. Ionic liquids and poly(ionic liquid)s for 3D printing – A focused mini-review. **European Polymer Journal**, v. 108, p. 390–398, 2018.

OBE, G. et al. Chromosomal Aberrations: Formation, Identification and Distribution. *Mutation Research*, Orlando, v. 504, n.5, p. 17-36, Oct. 2004.

OLIVEIRA, G.; FARIAS, F. O.; SOSA, F. H. B.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R. Green solvents to tune the biomolecules' solubilization in aqueous media: An experimental and in silico approach by COSMO-RS. **Journal of Molecular Liquids**. v. 341, 117314, 2021.

OLIVEIRA, G.; MARQUES, C.; OLIVEIRA, A.; SANTOS, A. A.; AMARAL, W. INEU, R. P.; LEIMANN; F. V.; PERON, A. P.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R. Extraction of bioactive compounds from *Curcuma longa* L. using deep eutectic solvents: In vitro and in vivo biological activities. **Innov Food Sci Emerg Technol.**, v. 70, 102697, 2021.

OLIVEIRA, G.; WOJEICCHOWISKI, J. P.; FARIAS, F. O.; IGARASHI-MAFRA, L.; SOARES, R. D. P.; MAFRA, M. R. Enhancement of biomolecules solubility in aqueous media using designer solvents as additives: an experimental and COSMO-based models' approach. **Journal of Molecular Liquids**. v. 318, 2020.

- OZTURK, B.; PARKINSON, C.; GONZALEZ-MIQUEL, M. Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents. **Separation and Purification Technology**, v. 206, p. 1–13, 2018.
- PASANPHAN, G. R.; BUETTNER, S. Chirachanchai, Chitosan Conjugated with Deoxycholic Acid and Gallic Acid: A Novel Biopolymer-based Additive Antioxidant for Polyethylene. **Applied Polymer**, 2008.
- PATIL, S. S.; RATHOD, V. K. Synergistic Effect of Ultrasound and Three Phase Partitioning for the Extraction of Curcuminoids from *Curcuma longa* and its Bioactivity Profile. **Process Biochem.** 93, 85–93, 2020.
- PATIL, S. S.; PATHAK, A.; RATHOD, V. K. Optimization and kinetic study of ultrasound assisted deep eutectic solvent-based extraction: A greener route for extraction of curcuminoids from *Curcuma longa*. **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 70, 105267, 2021.
- PEREIRA, C. V.; SILVA, J. M.; RODRIGUES, L.; REIS, R. L.; PAIVA, A.; DUARTE, A. R. C.; MATIAS, A. Unveil the Anticancer Potential of Limonene Based Therapeutic Deep Eutectic Solvents. **Scientific Reports**. 9, 2019.
- PERKO, T.; RAVBER, M.; KNEZ, Z.; SKERGET, M. Isolation, characterization and formulation of curcuminoids and in vitro release study of the encapsulated particles. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 103, p. 48–54, 2015.
- PROMMUAK, C.; DE-EKNAMKUL, W.; SHOTIPRUK, A. Extraction of flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxidant activity of extracts. **Sep. Purif. Technol**, 62, 444–448, 2008.
- PubChem Database, Natl. Cent. Biotechnol. (2020). Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 15 de agosto de 2020.
- RADOSEVIC, K.; CANAC, I.; PANIC, M.; MARKOV, K.; BUBALO, M. C.; FRECE, J.; SRCEK, V. G.; REDOVNIKOVIC, I. R. Antimicrobial, cytotoxic and antioxidative evaluation of natural deep eutectic solvents. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 25; p. 14188–14196, 2018.
- RADWAN, A.; AMIDON, G. L.; LANGGUTH, P. Mechanistic investigation of food effect on disintegration and dissolution of BCS class III compound solid formulations: the importance of viscosity. **Biopharmaceutics & Drugs Disposition**, v. 416, p. 403–416, 2012.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes Utilizados em Óleos, Gorduras e Alimentos Gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, 2006.
- RATHOD, V.; RAO, P. Effect of Three Phase Extraction with Ultrasound on Recovery and Antioxidant Activity of *Andrographis paniculata*. **J. Biol. Act. Prod. from Nat.** 4, 264–275, 2015.
- RIBEIRO, B. D.; FLORINDO, C.; LUCAS, C. I.; COELHO, M. A. Z.; MARRUCHO, I. M. Menthol-based Eutectic Mixtures: Hydrophobic Low Viscosity Solvents. **ACS Sustain. Chem. Eng.** 3, 2469–2477, 2015.
- RODRIGUES, A. F. S. et al. Aditivos alimentares. Conceitos, Aplicações e Toxicidade.

Editora Unicamp, 1ª ed., 2013.

RODRIGUEZ, JON-MARC G.; TOWNS, M. H. Analysis of student reasoning about Michaelis-Menten enzyme kinetics: mixed conceptions of enzyme inhibition. **Chemical Education Research and Practice**, p. 1–22, 2019.

RUBINO, J. T.; YALKOWSKY, S. H. Cosolvency and Deviations from Log-Linear Solubilization. **Pharm. Res.** 4, 1987.

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

SALES, I. M. S. ; SILVA, J. M. ; MOURA, E. S. R. ; ALVES, F. D. S. ; SILVA, F. C. C. ; SOUSA, J. M. C. ; PERON, A. P. Toxicity of synthetic flavorings, nature identical and artificial, to hematopoietic tissue cells of rodents. **Brazilian J. Biol.** 78, 306–310, 2018.

SANDLER, S. I. Chemical, Biochemical, and Engineering Thermodynamics, John Wiley and Sons Inc., 1999.

SANGHVI, R.; EVANS, D.; YALKOWSKY, S. H. Stacking complexation by nicotinamide: A useful way of enhancing drug solubility. **Int. J. Pharm.** v. 336, p. 35–41, 2007.

SANTOS, E. R. M. Extração caracterização e avaliação bioativa do extrato de rumex acetosa. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 105 f., 2013a.

SANTOS, P. S.; CHO, Y. N.; WOO, H. C.; CHUN, B. S. Green and efficient extraction of polysaccharides from brown seaweed by adding deep eutectic solvent in subcritical water hydrolysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 198, p. 1474-1484, 2018.

SAROUHAS, P.H.T. Application of statistical approaches for analysing the reliability and maintainability of food production lines: a case study of mozzarella cheese, in: D. Granato, G. Ares (Eds.). **Math. Stat. Methods Food Sci. Technol.**, Wiley-Blackwell, Noida, p. 53, 2014.

SCHMIDT, E.; BAIL, S.; BUCHBAUER, G.; STOILOVA, I.; ATANASOVAD, T.; STOYANOVA, A.; KRASTANOV, A.; JIROVETZ, L. Chemical Composition, Olfactory Evaluation and Antioxidant Effects of Essential Oil from Mentha x piperita. **Natural Prod. Commun.** 4, 1107–1112, 2009.

SCHMIDT, M. W.; BALDRIDGE, K. K.; BOATZ, J. A.; ELBERT, S. T.; GORDON, M. S.; JENSEN, J.H.; KOSEKI, S.; MATSUNAGA N.; NGUYEN, K. A.; SU, S.; WINDUS, T. L.; DUPUIS, M.; MONTGOMERY, J. A. General atomic and molecular electronic structure system. **J. Comput. Chem.** 14, 1347–1363, 1993.

SCHNEIDER, D. **Culinary Herbs & Spices Stock Art**. 2021. Disponível em: <<https://br.pinterest.com/pin/570972058999160645>>. Acesso em: 18 de agosto de 2021.

SCOPUS; Deep Eutectic Solvent. 2022. Disponível em: < <http://www.scopus.com/>>. Acesso em: 29 de março de 2022.

SEMAAN, D. G. et al. In vitro anti-diabetic activity of flavonoids and pheophytins from *Allophylus cominia* Sw. on PTP1B, DPPIV, alpha-glucosidase and alpha-amylase enzymes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 203, p. 39–46, 2017.

SENTHIL, S. L. et al. In vitro and in silico inhibition properties of fucoidan against amylase and  $\alpha$ -D-glucosidase with relevance to type 2 diabetes mellitus. **Carbohydrate Polymers**, v. 209, p. 350–355, 2019.

SEPTEMBRE-MALATERRE, A.; REMIZE, F.; POUCHERET, P. Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. **Food Research International**, v. 104, p. 86– 99, 2018.

SETSCHENOW, J. Ü ber Die Konstitution Der Salzlösungen Auf Grund Ihres Verhaltens Zu Kohlensäure. **Z. Phys. Chems.** v. 4, p. 117–125, 1989.

SHANKY, E.; TAKLA, S. S.; HAMMODA, H. M.; DARWISH, F. A. Evaluation of the influence of green extraction solvents on the cytotoxic activities of *Crinum* (Amaryllidaceae) alkaloid extracts using in-vitro-in-silico approach. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 227, p. 139–149, 2018.

SHEKAARI, H.; MOATTAR, M. T. M.; MOKHTARPOUR, M.; FARAJI, S. Exploring cytotoxicity of some choline-based deep eutectic solvents and their effect on the solubility of lamotrigine in aqueous media. **Journal of Molecular Liquids**. v. 283, p. 834–842, 2019.

SHIRSATH, S. R.; SABLE, S. S.; GAIKWAD, S. G.; SONAWANE, S. H.; SAINI, D. R.; GOGATE, P. R. Ultrasonics - Sonochemistry Intensification of extraction of curcumin from *Curcuma amada* using ultrasound assisted approach: Effect of different operating parameters. **Ultrason. - Sonochemistry** 38, 437–445, 2017.

SHISHOV, A.; POCHIVALOV, A.; NUGBIENYO, L.; ANDRUCH, V.; BULATOV, A. Deep eutectic solvents are not only effective extractants. **Trac Trends in Analytical Chemistry**. v. 129, 115956, 2020.

SILVA, J. M.; PEREIRA, C. V.; MANO, F.; SILVA, E.; CASTRO, V. I. B.; NOGUEIRA, I. S.; REIS, R. L.; PAIVA, A.; MATIAS, A. A.; DUARTE, A. R. C. Therapeutic Role of Deep Eutectic Solvents Based on Menthol and Saturated Fatty Acids on Wound Healing. **ACS Publications**. v. 10, p. 4346–4355, 2019.

SILVA, T.; SILVA, A. P. S. E.; DE ALMEIDA SANTOS, A.; RIBEIRO, K. G.; SOUZA, D. C.; DE BUENO, P. A. A.; MARQUES, M. M. M.; ALMEIDA, P. M.; PERON, A. P. Cytotoxicity, Genotoxicity, and Toxicity of Plant Biostimulants Produced in Brazil: Subsidies for Determining Environmental Risk to Non-Target Species. **Water. Air. Soil Pollut.** 231, 2020.

SKERGET, M.; PERKO, T.; RAVBER, M. Isolation , characterization and formulation of curcuminoids and in vitro release study of the encapsulated particles. **J. Supercrit. Fluids**. 103, 48–54, 2015.

SOARES, B.P.; ABRANCHES, D.O.; SINTRA, T.E.; LEAL-DUASO, A.; GARCÍA, J.I.; PIRES, E.; SHIMIZU, S.; PINHO, S.P.; COUTINHO, J.A.P. Glycerol Ethers as Hydrotropes and Their Use to Enhance the Solubility of Phenolic Acids in Water. **ACS Sustain. Chem. Eng.** v. 8, 2020.

SOARES, R. D. P.; FLÔRES, G. B.; XAVIER, V. B.; PELISSER, E. N.; FERRARINI, F.; STAUDT, P. B. Ivpp/sigma: LVPP sigma-profile database (18.07), (2017).

SONI, H.; PATEL, S. S.; PRADESH, M. Qualitative and quantitative profile of curcumin from ethanolic extract of *Curcuma longa* L.. **Int. Res. J. Pharm.** 4, 180–184, 2011.

SRINIVAS, V.; RODLEY, G.A.; RAVIKUMAR, K.; ROBINSON, W.T.; TURNBULL, M. M.; BALASUBRAMANIAN, D. Molecular organization in hydrotrope assemblies, **Langmuir**. v.13, p. 3235–3239, 1997.

STEFFEN, C.; THOMAS, K.; HUNIAR, U.; HELLWEG, A.; RUBNER, O.; SCHROER, A. TmoleX-A graphical user interface for TURBOMOLE. **J. Comput. Chem.** 31, 2010.

STEINBRECHER, A.; NIMPTSCH, K.; HÜSING, A. et al. Dietary glucosinolate intake and risk of prostate cancer in the EPIC-Heidelberg cohort study. **Int J Cancer**; v. 125, p. 2179-86, 2009.

STIERAND, K.; MAAß, P. C.; RAREY, M. Molecular complexes at a glance: Automated generation of two-dimensional complex diagrams. **Bioinformatics**, v. 22(14), p. 1710–1716, 2006.

SVIHUS, B.; HERVIK, A. K. Digestion and metabolic fates of starch, and its relation to major nutrition-related health problems: A review. **Starch/Stärke**, v. 68, n. 3, p. 302– 313, 2016.

SZYDŁOWSKA-CZERNIAK, A.; TROKOWSKI, K.; KARLOVITS, G.; SZŁYK, E. Effect of refining processes on antioxidant capacity, total contents of phenolics and carotenoids in palm oils. **Food Chemistry**, 129(3), 1187–1192, 2011.

TRESSERRA-RIMBAU, A.; GUASCH-FERRÉ, M.; SALAS-SALVADÓ, J. et al. Intake of total polyphenols and some classes of polyphenols is inversely associated with diabetes in elderly people at high cardiovascular disease risk. **J Nutr.**, 2016.

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 49, 2474–2478, 2005.

TROTT, O.; OLSON, A. J. Software News and Updates Gabedit — A Graphical User Interface for Computational Chemistry Softwares. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, p. 174–182, 2009.

VEILLET, S.; TOMAO, V.; CHEMAT, F. Ultrasound assisted maceration: An original procedure for direct aromatization of olive oil with Brazil. **Food Chemistry**, v. 123, p. 905-911, 2010.

- VILKHU, K.; MAWON, R.; SIMONS, L.; BATES, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 161-169, 2008.
- VILKOVÁ, M.; PŁOTKA-WASYLKA, J.; ANDRUCH, V. The role of water in deep eutectic solvent-base extraction, **J. Mol. Liq.** v. 304, 112747, 2020.
- WANG, S.; PENG, X.; ZHONG, L.; JING, S.; CAO, X. Choline chloride/urea as na effective plasticizer for production of cellulose films. **Carbohydrate Polymers**, v. 117.p. 133-139, 2015.
- WEI, Z.-F.; WANG, X.-Q.; PENG, X.; WANG, W.; ZHAO, C.-J.; ZU, Y.-G.; FU, Y.-J. Fast and green extraction and separation of main bioactive flavonoids from radix scutellariae. **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 175-181, 2015.
- WHITE, P. A; RASMUSSEN, J. B. The Genotoxic Wastes in Surface Waters. **Mutat Res.**, Madrid, v. 410, p. 223-236, Jan. 1998.
- WU, M.; ZHOU, W.; PEDERSEN, C. M.; MA, H.; QIAO, Y.; GUO, X.; HOU, X.; WANG, Y. Isomeric distribution of monosaccharides in deep eutectic solvents: NMR study. **Journal of Molecular Liquids**, v. 255, p. 244-249, 2018.
- XIAO-YU X.; XIAO, M.; SHA, L.; REN-YOU, G.; YA L. H. B. L. Bioactivity, Health Benefits, and Related Molecular Mechanisms of Curcumin: Current Progress, Challenges, and Perspectives. **Nutrients** 10, 1553–1586, 2018.
- XIE, L. Y.; BAI, J.; ZHANG, X.; CHEN, X.; BAI, X.; HU, S. Simultaneous determination of curcuminoids in *Curcumae Longae* Rhizoma and turmeric tea using liquid-phase microextraction based on solidification of floating deep eutectic solvent drop. **Microchemical Journal**. v. 159, 105341, 2020.
- XU, YANG; XIE, LIANGHUA; XIE, JIAHONG; LIU, YU; CHEN, W. Pelargonidin-3-O-rutinoside as a novel  $\alpha$ -glucosidase inhibitor for improving postprandial hyperglycemia. **Chemical Communications**, v. 55, p. 39–42, 2019.
- YOON, S. D.; KIM, Y. M.; KIM, B.; JE, J. Y. Preparation and antibacterial activities of chitosan-gallic acid/polyvinyl alcohol blend film by LED-UV irradiation. **J. Photochem. Photobiol. B Biol.** v. 176, p. 145–149, 2017.
- YUAN, C.; CHU, K.; LI, H.; SU, L.; YANG, K.; WANG, Y.; LI, X. In situ Raman and synchrotron X-ray diffraction study on crystallization of Choline chloride/Urea deep eutectic solvent under high pressure. **Chemical Physics Letters**, v. 661, p. 240-245, 2018.
- Z. SALLEH, Z.; WAZEER, I.; MULYONO, S.; EL-BLIDI, L.; HASHIM, M. A.; HADJ-KALI, M. K. Efficient removal of benzene from cyclohexane-benzene mixtures using deep eutectic solvents – COSMO-RS screening and experimental validation, **J. Chem. Thermodyn.** v. 104, p. 33–44, 2017.
- ZDANOWICZ, M.; WILPISZEWSKA, K.; SPYCHAJ, T. Deep eutectic solvents for polysaccharides processing. A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 200, p. 361-380, 2018.

ZHANG, L.; WANG, M. Optimization of deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Dioscorea opposita* Thunb. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 675-681, 2017.

ZHANG, Q.; DE OLIVEIRA VIGIER, K.; ROYER, S.; JÉRÔME, FRAN C. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 7108-7146, 2012.

ZHANGA, H.; WANGA, Y.; ZHOUB, Y.; CHENA, J.; WEIA, X.; XUA, P. Aqueous biphasic systems formed by deep eutectic solvent and new-type salts for the high-performance extraction of pigments. **Talanta**, v. 181, p. 210-216, 2018.

ZHEKENOV, T.; TOKSANBAYEV, N.; KAZAKBAYEVA, Z.; SHAH, D. Fluid Phase Equilibria Formation of type III Deep Eutectic Solvents and effect of water on their intermolecular interactions. **Fluid Phase Equilib.** v. 441, p. 43–48, 2017.

ZHENG, Y.; YANG, W.; SUN, W.; CHEN, S.; LIU, D. Inhibition of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase activity by chlorogenic acid. **Journal of Functional Foods**, v. 64, 2020.

ZHU, S.; ZHOU, J.; JIA, H.; ZHANG, H. Liquid–liquid microextraction of synthetic pigments in beverages using a hydrophobic deep eutectic solvent. **Food Chemistry**, v. 243, p. 351-356, 2018.