



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Mayara Kuasnei

EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS DO TEGUMENTO DE FEIJÃO PRETO COM
SOLUÇÕES AQUOSAS DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS POR TÉCNICAS
EMERGENTES

Florianópolis

2021

Mayara Kuasnei

EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS DO TEGUMENTO DE FEIJÃO PRETO COM
SOLUÇÕES AQUOSAS DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS POR TÉCNICAS
EMERGENTES

Dissertação submetida ao Programa de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Engenharia de alimentos.

Orientador: Prof. Acácio A. F. Zielinski, Dr.

Coorientadora: Profa. Sandra R. S. Ferreira, Dra.

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Kuasnei, Mayara

Extração de antocianinas do tegumento de feijão preto com soluções aquosas de solventes eutéticos profundos por técnicas emergentes / Mayara Kuasnei ; orientador, Acácio Antonio Ferreira Zielinski, coorientador, Sandra Regina da Silva Ferreira, 2021.
116 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, , Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Extração de compostos bioativos do tegumento de feijão preto, utilizando solventes eutéticos profundo (DES). 3. Estabilidade e concentração dos extratos de antocianinas. I. Antonio Ferreira Zielinski, Acácio . II. Regina da Silva Ferreira, Sandra . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Título: Extração de antocianinas do tegumento de feijão preto com soluções aquosas de solventes eutéticos profundos por técnicas emergentes

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Acácio Antonio Ferreira Zielinski - Presidente - UFSC

Profª. Vania Zanella Pinto, Dra.

Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Profª. Aline Alberti, Dra.

Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestra em Pós-graduação em Engenharia de alimentos.

Profª. Sandra R. S. Ferreira, Dra.

Coordenador(a) do Programa

Prof. Acácio A. F. Zielinski, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2021

Dedico...

... A minha mãe, às minhas irmãs e todos aqueles que acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, me concedendo saúde e força para superar as dificuldades nessa pandemia, a minha mãe e as minhas 7 irmãs por serem minha fortaleza. Gostaria de agradecer em especial, a minha irmã Mara e sobrinha Laura, por me apoiarem, por todo amor e carinho. Tudo que tenho eu devo a vocês. Aos meus sobrinhos e minha afilhada Sofia que mesmo muito pequena entende minha ausência, amo-os acima de tudo. Estendo meus agradecimentos para todos os demais familiares que sempre me incentivaram a correr atrás dos meus objetivos.

Agradeço aos meus orientadores Acácio A. F. Zielinski e Sandra R. S. Ferreira por toda confiança depositada a mim para a realização deste trabalho, por sempre estarem à disposição para me auxiliar, me guiando e dando todo o suporte necessário para a realização do mesmo. Obrigada professores por repartir seus conhecimentos, vivência e experiência. Agradeço a professora Aline, a professora Vania e o professor Alan por aceitarem fazer parte da banca, pela disponibilidade de tempo e também por todo conhecimento compartilhado para a realização deste trabalho.

Quero agradecer os meus amigos que o Mestrado me proporcionou e dizer que eu não sei o que seria de mim sem vocês. Obrigada Nathalia, Eduardo, Juliane, Helia, Jonas, Paulinho Guilherme e Anderson por estarem comigo em todos os momentos felizes e tristes. Espero do fundo do meu coração que vocês sejam muito felizes e tenham uma carreira profissional e pessoal maravilhosa, vocês são muito especiais para mim, amo cada um de vocês.

À doutoranda, Laís, que sempre foi um grande exemplo para mim, e hoje, agradeço por ter me auxiliado e apoiado no trabalho. Aos colegas do LATESC, que mesmo neste momento de pandemia me ajudaram para realização deste trabalho, compartilhando momentos únicos. Agradeço a CAPES pelo suporte financeiro, a Universidade Federal de Santa Catarina e ao PPGEAL por ter a oportunidade de fazer parte deste programa incrível.

Muito obrigada por tudo!

“Pensei mais um milhão de vezes em parar, em desistir de mim por não acreditar e hoje eu sou o meu melhor motivo para comemorar”.

(Kell Smith)

RESUMO

Existe atualmente um grande interesse na busca de novas fontes de pigmentos naturais que possam, mediante o seu consumo, tornar a dieta mais funcional e saudável. O feijão tem chamado a atenção de pesquisadores por conter alta quantidade de compostos bioativos benéficos à saúde. Dentre esses compostos destacam-se as antocianinas (presentes nos tegumentos), que são compostos antioxidantes responsáveis também pela cor vermelha, azul, roxa e laranja de muitas espécies vegetais. Entretanto, no processo de colheita e beneficiamento de feijões é gerada uma grande quantidade de resíduos com baixo valor comercial, as “bandinhas”. Esse termo é popularmente utilizado para classificar os grãos de feijão quebrados obtidos durante o beneficiamento do produto. Nesse contexto, a finalidade deste trabalho foi obter extratos ricos em compostos fenólicos e antocianinas a partir do resíduo industrial de feijão (*Phaseolus vulgaris*), utilizando diferentes processos de extração e solventes alternativos, a fim de avaliar o potencial funcional desses extratos. Para isto, foi realizada uma triagem preliminar por maceração empregando 5 diferentes solventes eutéticos profundos (DES), o que resultou na indicação da mistura de cloreto de colina:ácido cítrico como DES, devido ao baixo custo, adequadas propriedades físico-químicas e maior extração de antocianinas monoméricas totais. Após seleção do solvente, foi realizada a extração com água subcrítica (SWE) mediante a variação de vazão (de 3 a 5 mL/min), temperatura (de 90 a 130 °C) e concentração de DES (cloreto de colina:ácido cítrico), de 1 a 9%. Também foi realizada a extração assistida por ultrassom, do inglês Ultrasound Assisted Extraction (UAE), tendo como variáveis, potência, de 150 W a 450 W, temperatura de 30 a 70 °C e concentração do DES selecionado de 1 a 9%. Todos os extratos obtidos foram avaliados em termos de conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT), teor de antocianinas monoméricas totais (AMT) e atividade antioxidante (AA) pelos métodos DPPH e ABTS. As antocianinas presentes em todos os extratos foram também identificadas e quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência. Para todos os compostos estudados (CFT, AMT e AA) o método UAE apresentou melhores resultados quando comparado com SWE, sendo de aproximadamente 40% a mais para AMT, 52% para CFT, 53% para AA por DPPH e 71% para AA por ABTS. Com isso, esta técnica foi selecionada para avaliar a estabilidade e a concentração do extrato nos compostos bioativos alvo. Para a estabilidade, os extratos com DES selecionado mostraram ser protetores quanto a degradação das antocianinas em relação a temperatura e a luz, quando comparado aos extratos em água. Visto a adequada estabilidade das AMT com o DES, um desafio foi proposto de concentração do extrato, sem perder a qualidade. Para isto, o método de crioconcentração em blocos assistido por centrifugação foi realizado, sendo eficaz, tendo um aumento de aproximadamente 3 vezes da concentração inicial de AMT. Diante disso, a UAE com solventes alternativos como DES, e a concentração do extrato por crioconcentração permitiram obter resultados satisfatórios e sugerem um grande potencial para o aproveitamento do resíduo de feijão para a obtenção de extratos com alto valor agregado.

Palavras-chave: Compostos bioativos. Corante natural. Solventes alternativos. Subproduto.

ABSTRACT

There is currently great interest in the search for new sources of natural pigments that can, through their consumption, make the diet more functional and healthier. The bean has attracted the attention of researchers because it contains a high amount of bioactive compounds beneficial to health. Among these compounds, the anthocyanins (present in integuments) stand out, which are antioxidant compounds that are also responsible for the red, blue, purple and orange color of many plant species. However, in the process of harvesting and processing beans, a large amount of waste with low commercial value is generated, the “bandinhas”. This term is popularly used to classify the broken bean grains obtained during the processing of the product. In this context, the purpose of this work was to obtain extracts rich in phenolic compounds and anthocyanins from the industrial residue of beans (*Phaseolus vulgaris*), using different extraction processes and alternative solvents, in order to evaluate the functional potential of these extracts. For this, a preliminary screening by maceration was carried out using 5 different deep eutectic solvents (DES), which resulted in the indication of the mixture of choline chloride: citric acid as DES, due to the low cost, adequate physical-chemical properties and greater extraction of total monomeric anthocyanins. After solvent selection, extraction with subcritical water (SWE) was performed by varying the flow rate (from 3 to 5 mL / min), temperature (from 90 to 130 ° C) and DES concentration (choline chloride: citric acid), from 1 to 9%. Ultrasound-assisted extraction (UAE) was also performed, having as variables, power, from 150 W to 450 W, temperature from 30 to 70 ° C and concentration of the DES selected from 1 to 9%. All extracts obtained were evaluated in terms of content of total phenolic compounds (CFT), content of total monomeric anthocyanins (AMT) and antioxidant activity (AA) by the DPPH and ABTS methods. The anthocyanins present in all extracts were also identified and quantified by high performance liquid chromatography. For all the studied compounds (CFT, AMT and AA) the UAE method showed better results when compared to SWE, being approximately 40% more for AMT, 52% for CFT, 53% for AA by DPPH and 71% for AA by ABTS. Thus, this technique was selected to assess the stability and concentration of the extract in the target bioactive compounds. For stability, extracts with selected DES have shown to be protective against anthocyanin degradation in relation to temperature and light, when compared to extracts in water. In view of the adequate stability of AMT with DES, a challenge was proposed to concentrate the extract, without losing quality. For this, the centrifugation-assisted block cryoconcentration method was performed, being effective, with an increase of approximately 3 times the initial AMT concentration. In view of this, the UAE with alternative solvents such as DES, and the concentration of the extract by cryoconcentration allowed to obtain satisfactory results and suggest a great potential for the use of the bean residue to obtain extracts with high added value.

Keywords: Emergent solvents. Bioactive compounds. By-product. Natural colorant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química básica das antocianinas.....	25
Figura 2 - Estrutura química das antocianinas individuais majoritárias nos tegumentos de feijão.	26
Figura 3 - Mistura de cloreto de colina como HBA e o ácido cítrico como HBD para a produção de DES.....	28
Figura 4 - Diagrama da unidade de extração por maceração.	32
Figura 5 - Diagrama da unidade de extração por água subcrítica.	34
Figura 6 - Diagrama do sistema de extração por sonda ultrassônica.....	35
Figura 7 - Diagrama esquemático da lise celular causada por bolhas de cavitação.	36
Figura 8 - Extração de Antocianinas com diferentes DES em diferentes concentrações.....	52
Figura 9 - Cinética da extração de antocianinas pelo método de SWE.....	53
Figura 10 - Superfície de resposta para antocianinas monoméricas totais (AMT), compostos fenólicos (CFT) e atividade antioxidante (DPPH e ABTS), obtidos pelo método SWE.	58
Figura 11 - Gráfico da desejabilidade obtido para as variáveis respostas AMT, DPPH e ABTS em função das variáveis independentes temperatura, concentração de solvente e vazão.	59
Figura 12 - Cromatograma de HPLC representativo do extrato de antocianina. Os espectros de massas correspondentes a cada composto são mostrados em cima de cada pico. Picos: (I) delphinidina-3-O-glicosídeo; (II) petunidina-3-O-glicosídeo; e (III) malvidina-3-O-glicosídeo.	61
Figura 13 - Condição de congelamento dos extratos de antocianinas dos tegumentos de feijão preto.....	71
Figura 14 - Procedimento experimental geral	72
Figura 15 - Cinética da extração de antocianinas pelo método de UAE.....	74
Figura 16 - Superfície de resposta para antocianinas monoméricas totais (AMT), compostos fenólicos (CFT) e atividade antioxidante (DPPH e ABTS), obtidos pelo método UAE.	79
Figura 17 - Gráfico da desejabilidade obtido para as variáveis respostas AMT, CFT, DPPH e ABTS em função das variáveis independentes temperatura, concentração de solvente e potência.....	80
Figura 18 - Efeito do aquecimento nas temperaturas de 60, 70, 80 e 90 °C ao longo do tempo na estabilidade do extrato aquoso de antocianinas, utilizando 8,2% de DES e água.	84
Figura 19 - Efeito da exposição à luz na estabilidade dos extratos de antocianinas em 8,2% de DES e extratos em água do tegumento de feijão preto.....	87

Figura 20 - Evolução do teor de antocianinas monoméricas totais do concentrado e da fração de gelo em função do ciclo de crioconcentração de extrato de antocianinas. 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Trabalhos utilizando solventes eutéticos profundos (DESs) na extração.....	29
Tabela 2 - Propriedades dos DES.	44
Tabela 3 - Planejamento fatorial Box-Benhken.	46
Tabela 4 - Resultados experimentais obtidos para o teor de antocianinas manoméricas totais (AMT), compostos fenólicos totais (TPC) e para atividade antioxidante in vitro por DPPH e ABTS.....	55
Tabela 5 - Valores paramétricos da equação polinomial de segunda ordem, para cada método de extração e informações estatísticas do procedimento de ajuste do modelo.....	57
Tabela 6 - Valores preditos e experimentais das variáveis, no ponto ótimo da extração.....	60
Tabela 7 - Concentrações de antocianinas monoméricas individuais determinadas por HPLC dos extratos SWE.	62
Tabela 8 - Planejamento fatorial Box-Benhken, para encontrar melhores parâmetros experimentais.....	67
Tabela 9 - Resultados experimentais obtidos para os teores de antocianinas monoméricas totais (AMT), compostos fenólicos (CFT) e potencial antioxidante dos extratos, por técnicas in vitro (DPPH e ABTS).	76
Tabela 10 - Valores paramétricos da equação polinomial de segunda ordem, para cada método de extração e informações estatísticas do procedimento de ajuste do modelo.....	78
Tabela 11 - Valores preditos e experimentais das variáveis, no ponto ótimo da extração.....	81
Tabela 12 - Efeito da temperatura nos valores k, t (1/2), D e Q10 para degradação de antocianinas entre 60 a 90 ° C.	82
Tabela 13 - Parâmetros termodinâmicos obtidos para a degradação de antocianinas durante o aquecimento.....	85
Tabela 14 - Parâmetros cinéticos do efeito da luz na estabilidade dos extratos de antocianinas do tegumento de feijão preto.	86
Tabela 15 - Solute recuperado, gelo, porcentagem de concentrado e eficiência.....	89
Tabela 16 - Solute recuperado, gelo, porcentagem de concentrado e eficiência.....	89
Tabela 17 - Concentrações de antocianinas monoméricas individuais determinadas por HPLC dos extratos UAE e concentrados.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs: Absorbância
AA: atividade antioxidante
ABTS: 2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina- 6-ácido sulfônico)
AMT: Antocianinas monoméricas totais
ANOVA: Análise de variância
Ca: Ácido cítrico
CFT: Compostos fenólicos totais
ChCl: Cloreto de colina
CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento
DES: Solventes eutéticos profundos
DPPH: Radical 2,2-difenil-1-picril- hidrazila
UAE: Extração assistida por ultrassom
HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência
La: Ácido Láctico
Ma: Ácido málico
ME: Extração por maceração
MSR: Metodologia de superfície de resposta
pH: Potencial hidrogeniônico
Pro: Propanodiol
SWE: Extração por água subcrítica
TRAP: Potencial total de captura de radica
UAE: Extração assistida por ultrassom

SUMÁRIO

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO	16
INTRODUÇÃO.....	18
OBJETIVOS.....	21
Objetivo Geral	21
Objetivos específicos.....	21
CAPÍTULO 1	22
1.1 FEIJÃO.....	23
1.2 COMPOSTOS FENÓLICOS	24
1.2.1 Antocianinas	25
1.3 SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS (DES)	27
1.4 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS	31
1.4.1 Extração por maceração (ME).....	32
1.4.2 Extração por água subcrítica (SWE)	33
1.4.3 Extração assistida por ultrassom (UAE).....	34
1.5 OTIMIZAÇÃO POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR)	36
1.6 ESTABILIDADE DOS EXTRATOS COM DES.....	37
1.7 CRIOCONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS.....	38
1.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
CAPÍTULO 2	41
2.1 INTRODUÇÃO.....	42
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.2.1 Preparação de material vegetal	43
2.2.2 Determinação do teor de umidade	43
2.2.3 Preparação, caracterização e seleção dos solventes.....	44
2.2.4 Projeto de triagem para SWE	45
2.2.5 Otimização de extração de antocianinas com água e DES por SWE	45
2.2.6 Avaliação de antocianinas manoméricas totais (AMT).....	47
2.2.7 Determinação da capacidade antioxidante in vitro por DPPH e ABTS	48
2.2.8 Avaliação de compostos fenólicos (CFT)	49
2.2.9 Identificação e quantificação das antocianinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrometria de massas	49
2.2.10 Análise estatística	50

2.3 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	50
2.3.1 Preparação e escolha dos DES para extração de antocianinas	50
2.3.2 Cinética da extração por SWE.....	52
2.3.3 Otimização da extração em SWE	53
2.3.4 Condições ideais de extração por SWE.....	58
2.3.5 Quantificação das antocianinas presentes nos extratos por HPLC.....	60
2.4 CONCLUSÃO	61
CAPÍTULO 3	63
3.1 INTRODUÇÃO.....	64
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	65
3.2.1 Preparação de material vegetal	65
3.2.2 Otimização de extração por UAE.....	66
3.2.4 Estabilidade dos extratos ricos em antocianinas.....	67
3.2.5 Avaliação do efeito da luz na degradação da antocianina	70
3.2.6 Crioconcentração em blocos assistida por centrifugação	70
3.2.7 Identificação e quantificação das antocianinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	73
3.2.8 Análise estatística	74
3.3 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	74
3.3.1 Cinética da extração por UAE	74
3.3.2 Otimização da extração assistida por ultrassom (UAE).....	75
3.3.3 Estabilidade dos extratos com cloreto de colina:ácido cítrico pelo método de UA	82
3.3.4 Crioconcentração dos extratos ricos em antocianinas	87
3.3.5 Quantificação das antocianinas presentes nos extratos por HPLC.....	89
3.4 CONCLUSÃO.....	91
CONSIDERAÇÕES FINAIS	92
PROPOSTAS DE TRABALHOS FUTUROS	93
REFERÊNCIAS.....	94

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS DO TEGUMENTO DE FEIJÃO PRETO COM SOLUÇÕES AQUOSAS DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS POR TÉCNICAS EMERGENTES

Por quê?

- Apresentar técnicas de extração para a valorização de um produto de baixo valor de mercado, derivado da leguminosa mais produzida no mundo, depois da soja, os feijões pretos quebrados;
- Combinação de métodos alternativos de extração com solventes verdes DES mostram alta eficiência de extração e preservação dos compostos bioativos;
- O tegumento do feijão preto é rico em compostos com elevado potencial biológico, como as antocianinas;
- A busca por compostos bioativos deve estar associada à produção limpa, segura e com baixa geração de resíduos. Assim, o uso de tecnologias não convencionais de extração e solventes verdes permitem a obtenção desses compostos mediante o aproveitamento de um subproduto agroindustrial, reduzindo assim a geração de resíduos.
- Concentrar os extratos empregando uma técnica como a crioconcentração permite, além de concentrar os extratos, preservar os compostos ativos presentes.

Quem já fez?

- Na literatura existem trabalhos envolvendo o emprego das técnicas UAE e SWE, com o uso de DES como solventes para a recuperação de compostos bioativos de diversas matérias-primas, entretanto, estudos utilizando os DES em técnicas UAE e SWE aplicadas para tegumento de feijão não foram encontradas;
- Os estudos de extração de antocianinas e demais compostos fenólicos a partir do tegumento de feijão foram realizados apenas mediante o emprego de técnicas convencionais de extração e solventes tradicionais;
- Nenhum trabalho disponível na literatura empregou a técnica de crioconcentração para a concentração e proteção dos extratos do tegumento de feijão, os trabalhos disponíveis apenas consideram diversos tipos de sucos de frutas;

Hipóteses:

- É possível obter extratos do tegumento de feijão ricos em antocianinas utilizando DES?
- A adição de DES na SWE e UAE, mesmo em pequenas quantidades, aumenta a recuperação de antocianinas?
- DES têm efeito protetor nas antocianinas após a extração? É possível obter extratos do tegumento de feijão ricos em antocianinas utilizando DES?
- Quais antocianinas majoritárias estão presentes no tegumento de feijão?
- É possível concentrar por crioconcentração o extrato recuperado do tegumento de feijão, para futura aplicação?

Como fazer?

- Otimizar o processo de preparação do material vegetal (retirada do tegumento dos feijões quebrados);
- Preparação, caracterização e seleção dos solventes DES
- Otimizar a extração não convencional (UAE e SWE) com os solventes DES, visando a maior recuperação dos compostos (antocianinas monoméricas totais, compostos fenólicos e potencial antioxidantes) em cada técnica;
- Quantificar o perfil químico de antocianinas nos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas;
- Verificar a estabilidade dos extratos recuperados à luz, em diferentes temperaturas;
- Avaliar o efeito da técnica crioconcentração na degradação dos compostos bioativo presentes nos extratos, visando aplicação futura dos extratos ricos em antocianinas.

INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é amplamente consumido no Brasil, constituindo-se de importante fonte de proteínas, carboidratos, fibras e minerais, sendo um alimento básico para a população brasileira (LOS et al., 2019). Com uma produção anual de 2,9 milhões de toneladas em 2019, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de feijão (FAOSTAT, 2020). Entretanto, durante colheita, beneficiamento e armazenamento podem ocorrer perdas destes grãos. As principais perdas são devidas aos danos mecânicos causadas pela colheita e pelas mesas classificadoras que acabam proporcionando rupturas dos grãos que contribuem para a perda do valor de mercado (ANDRADE et al., 1999; KHAZAEI, 2009).

Além destas, podem haver também alterações bioquímicas durante o armazenamento que geram grãos denominados *hard-to-cook* (CAMPOS et al., 2015). Uma das alternativas promissora para o aproveitamento destes grãos é a utilização dos tegumentos dos feijões quebrados na extração de corantes naturais, visto que estes tegumentos dos feijões (principalmente os coloridos) apresentam uma grande quantidade de compostos fenólicos, entre eles as antocianinas (BRIGIDE; CANNIATTI, 2011; TEIXEIRA et al., 2021).

Esta pode ser uma alternativa recomendada, pois os consumidores estão cada vez mais preocupados com a qualidade de vida e bons hábitos alimentares, dando preferência para produtos alimentícios elaborados com aditivos naturais em substituição aos artificiais, devido à forte relação entre saúde e dieta (MARTINS; SENTANIN; SOUZA, 2019). Atualmente, o uso extensivo de corantes artificiais para tornar os alimentos mais atraentes aos consumidores, tem sido relacionado a efeitos nocivos a saúde humana como toxicidade a médio e longo prazos diminuindo o interesse por esses alimentos (CAROCHO et al., 2014; MARTINS et al., 2016).

Muitos avanços no desenvolvimento de corantes alimentares estão sendo feitos nos últimos anos. Acredita-se que o mercado de corantes naturais crescerá em escala global maior do que de corantes sintéticos, devido à contínua pressão do consumidor pelo “natural” (DOWNHAM; COLLINS, 2000). Segundo Chen et al., (2006), a estimativa desse crescimento é de 5,9% para os próximos anos. Uma abordagem bem sucedida para novas cores naturais tem sido o uso de fontes alternativas de matérias-primas anteriormente inexploradas, como exemplo pigmentos à base de antocianina das mais variadas fontes (DOWNHAM; COLLINS, 2000; CHEN et al., 2006).

As antocianinas são compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonoides, e responsáveis pelas colorações que variam do vermelho ao azul em flores, vegetais e frutas (LÓPEZ et al., 2019; KOWALSKA et al., 2021). No entanto, as antocianinas são suscetíveis à

degradação, sendo muito instáveis a vários fatores como pH, temperatura e presença de luz. Essa é uma das preocupações que está sendo estudada, visto que a estabilidade das antocianinas é essencial para garantir a qualidade e a entrega desses componentes bioativos em produtos que são aplicados (POJER et al., 2013; LÓPEZ et al., 2019).

A recuperação destes compostos é muito específica e requer estudos para controlar as variáveis que afetam a eficiência do processo. Uma maneira de minimizar as limitações de extração de compostos é a escolha adequadas das variáveis e dos métodos para extração, sendo crucial para o sucesso da operação (BACKES et al., 2018; PINELA et al., 2019). Vários métodos estão descritos na literatura para a extração de antocianinas, no entanto, cada matéria-prima apresenta suas especificidades (ALBUQUERQUE et al., 2020).

Normalmente, muitos processos de extração empregam compostos orgânicos como solventes de extração e estes, em trabalhos recentes, vêm sendo substituídos por solventes eutéticos profundos (DES), pois muitos deles têm sido considerados mais verdes. Segundo alguns estudos, a combinação desses novos solventes com métodos alternativos de extração tem se mostrado eficiente para a recuperação de compostos fenólicos (CHANIOTI et al., 2018; BENVENUTTI et al., 2020; TEIXEIRA et al., 2021).

No entanto, os DES apresentam baixa pressão de vapor, que dificulta a remoção da água dos extratos quando estes DES estão presentes. Consequentemente impossibilita a utilização de métodos de concentração dos extratos (remoção da água) em temperaturas elevadas, o que estimula a busca por métodos alternativos para sua concentração (NIKNADDAF et al. 2018; HANSEN et al., 2020). A crioc Concentração, ou concentração por congelamento é o método que mais se aproxima do objetivo ideal de separar a água sem afetar os demais componentes de uma mistura (SÁNCHEZ et al., 2010).

A crioc Concentração é uma técnica promissora para concentração, pois utiliza como princípio básico a redução da atividade de água de soluções pelo processo de congelamento (PETZOLD et al., 2016; SAFIEI et al. 2020), o que pode ser uma alternativa para aplicação em extratos com DES, devido à baixa pressão de vapor destes. Segundo Sánchez et al., (2010) e Lazzarotto et al., (2017) a crioc Concentração é certamente um dos melhores processos de concentração para a preservação das características funcionais e nutricionais dos extratos. As novas tecnologias de extração como SWE e UAE, e concentração por crioc Concentração vêm sendo utilizada com a função de aumentar a quantidade e qualidade dos compostos extraídos, diminuindo o tempo e a energia necessária para processo.

O presente trabalho foi dividido em três capítulos. O Capítulo 1 é dedicado a revisão bibliográfica. No Capítulo 2 é descrita a seleção dos DES que apresentam bom potencial para

a extração de antocianinas. A partir do DES selecionado, uma otimização multi-resposta foi utilizada para aplicação desde DES adicionado ao método de água subcrítica. Por fim, no Capítulo 3 a técnica de extração assistida por ultrassom foi explorada. Além disso, os extratos ricos em antocianinas tiveram sua estabilidade química estudada. A crioconcentração assistida por centrifugação foi empregada para concentração dos extratos.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar DES como solventes alternativos, aliados com tecnologias emergentes para extração e concentração de antocianinas dos tegumentos de feijão preto com baixo valor de mercado.

Objetivos específicos

- *Selecionar* os solventes eutéticos profundos (DES) para a extração de antocianinas.
- *Empregar* técnicas emergentes para a extração das antocianinas do resíduo de feijão preto, como os métodos de ultrassom e de água subcrítica.
- *Otimizar* as condições ótimas de extração por ultrassom e por água subcrítica, avaliando as variáveis independente temperatura, concentração de DES, potência e vazão e variáveis dependentes como antocianinas monoméricas totais, compostos fenólicos e potencial antioxidante de DPPH e ABTS.
- *Caracterizar* quimicamente os extratos ricos em antocianinas.
- *Verificar* a proteção dos DES nas antocianinas presente nos extratos.
- *Concentrar* o extrato rico em antocianinas por crioconcentração assistida por centrifugação.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DA LITERATURA

1.1 FEIJÃO

O feijão é uma leguminosa amplamente difundida em todo o mundo, com uma área cultivada de 36,5 milhões de hectares em 2017 e uma produção de 31,4 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2020). No Brasil a maior parte do feijão vem da agricultura familiar, que é responsável por cerca de 60% da produção nacional. Os produtores maiores optam por produzir a leguminosa como uma aposta de curto prazo (os três meses entre o plantio e a colheita) em meio a suas atividades principais. E isso só acontece quando os preços não estão tão baixos (EPAGRI, 2012). Para muitas populações de países emergente como na América Latina, Ásia e África, os feijões representam uma alternativa barata, usado como fonte de energia, porém nas últimas décadas, ocorreu uma diminuição do seu consumo. Mudanças no estilo de vida, desconforto intestinal e cultural pode estar limitando as preferências dos consumidores (ALFARO et al., 2020).

Como destacado, uma das causas dessa diminuição do consumo é o desconforto intestinal devido ao armazenamento inadequado, que resulta no aumento do tempo de cozimento e diminuição da qualidade nutricional e sensorial do feijão (FERREIRA et al., 2018). No entanto, o consumo dessa leguminosa é de extrema importância, uma vez que, o conteúdo de proteína do feijão (23 à 25 %), em especial o feijão preto, é maior do que muitos alimentos, como o da do leite (3,1 à 3,9 %), da carne (21 à 22 %), e até mesmo do ovo (10 à 12 %). E mesmo que a metade dessas proteínas totais tenha baixa digestibilidade, a quantidade presente nessa semente é muito alta. Além disso, o tegumento do feijão preto é rico em antocianinas quando comparada com os outros tipos de feijões, como o branco e o carioca (ZHENG et al., 2019; MADRERA et al., 2020; MAZZUCO, 2008; OLIVEIRA et al., 2010; FROTA; SOARES; ARÊAS, 2008; MORENO et al., 2011).

As antocianinas presentes, principalmente nos tegumentos de feijão preto, podem ser usadas como suplementos ou corantes naturais em alimentos. Podem também apresentar benefícios para a saúde, fornecendo um importante potencial biológico que pode contribuir para modular marcadores de diabetes (MOJICA et al., 2015). Além de estudos apresentarem a ação favorável na prevenção de colesterol, propriedades anti-inflamatórias e agentes promissores na prevenção de doenças degenerativas como câncer, mal de Alzheimer e doenças cardiovasculares, devido às suas propriedades antioxidantes (CHEN et al., 2006; HOLLMAN; KATAN, 1999; MACZ et al., 2006; REYNERTSON et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2021).

Durante o beneficiamento do feijão, os grãos (denominados de bandinhas) são separadas das sementes inteiras no processo, que ocorre após a colheita, realizado por duas máquinas

principais, a máquina de ar juntamente com uma peneira e a mesa densimétrica. A máquina de ar e a peneira tem a função de separar sementes quebradas e outras impurezas de tamanho e densidade próximos da semente. Já a mesa densimétrica classifica por peso específico, separando as sementes leves, atacadas por insetos, das sementes inteiras e bem formadas (BRASIL, 2012).

A quebra dos grãos, devido aos danos mecânicos, que ocorrem na colheita e são separadas no beneficiamento, gera uma quantidade importante de coproduto de baixo valor comercial, aproximadamente 13%. Os feijões quebrados (bandinhas) são usados principalmente na alimentação animal ou para obter farinhas extrusadas, com maior interesse na fração de cotilédones, devido ao seu maior teor de proteína em comparação com os tegumentos. No entanto, os tegumentos dos feijões pretos representam 15% dos grãos quebrados e contêm a maior concentração de compostos fenólicos, como as antocianinas. Visto que os tegumentos dessas sementes quebradas apresentam uma grande quantidade de compostos bioativos, esses subprodutos podem ser uma alternativa para agregar valor aos feijões quebrados que na maioria das vezes não são utilizados (TEIXEIRA et al., 2021).

1.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

Um dos grupos mais abundantes de compostos bioativos presentes em plantas, frutas e vegetais, são os polifenóis. Eles podem conferir diversas propriedades organolépticas como amargor, adstringência, cor e sabor. Entretanto, o seu grande interesse está nos benefícios que podem proporcionar a saúde. Diferentes estudos têm revelado que estes podem ter potencial de prevenção contra várias doenças (AHMED et al., 2020; JIA; DUMONT; ORSAT; 2016).

Os compostos fenólicos são originários do metabolismo secundário das plantas que produzem esses próprios constituintes como substâncias de defesa. Apresentam em sua estrutura pelo menos um anel aromático associado com um ou mais grupos hidroxílicos (PARR; BOLWELL, 2000, ROCHA-GUZMÁN et al., 2007). O mecanismo de ação desses compostos pode ocorrer de diferentes maneiras, produzindo modificações em expressão gênica que afetam positivamente os principais órgãos e tecidos como pâncreas, tecido adiposo, fígado e músculo (MEDINA et al., 2020).

Os compostos fenólicos, carotenóides e vitaminas C e E são os principais componentes com atividades antioxidantes. A maioria dos estudos sobre compostos bioativos de plantas se importam com a extração e utilização de solventes, para obterem bom resultados. Sabe-se que a eficácia e complexidade das propriedades antioxidantes extraída de uma mistura depende

muito dos fatores de extração. Após este processo de recuperação, vários ensaios *in vitro* e *in vivo* são realizados, para identificar esses antioxidantes presentes nos extratos de plantas (GONZALES; VILLENA; KITAZONO, 2021).

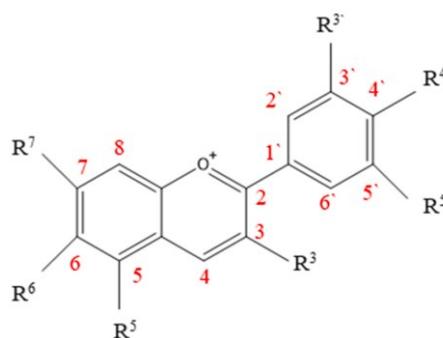
Esses antioxidantes extraídos, como compostos fenólicos, são reconhecidos como constituintes vitais. Partes desses compostos derivados de raiz, tegumento, casca, folhas, frutos e sementes podem ser usados para tratamentos de muitas doenças do corpo humano (AHMED et al., 2020). O feijão é um exemplo de semente que contém grande quantidade de compostos fenólicos, e o que apresenta maior fração são os flavonoides, entre eles as antocianinas, flavanóis, flavonóis, isoflavonas, flavanonas, proantocianidinas, taninos, além de uma ampla gama de ácidos fenólicos (GAN et al., 2016).

1.2.1 Antocianinas

O termo antocianina é de origem grega (*anthos*, uma flor, e *kyanos*, azul escuro). As antocianinas são uns dos grupos de pigmentos mais importantes de origem vegetal. Compõem o maior grupo de pigmentos solúveis em água e são encontradas em maior quantidade nas angiospermas (LOPES et al., 2007).

Quimicamente, as antocianinas, um subgrupo dos flavonóides, possuem vários grupos fenil (radical derivado de um anel aromático). Os diferentes radicais, a posição da molécula e os ácidos ligados caracterizam as moléculas de antocianina, especificando a sua cor (vermelho, azul, roxo e laranja). As antocianinas possuem estrutura baseada em uma ou mais unidades de açúcar ligado ao núcleo flavílico (estrutura química composta por 2-fenilbenzopirílio) apresentada na figura 1. A estrutura é formada por quinze carbonos e um oxigênio (LIMA et al., 2007; JIANG et al., 2020; FILHO et al., 2021).

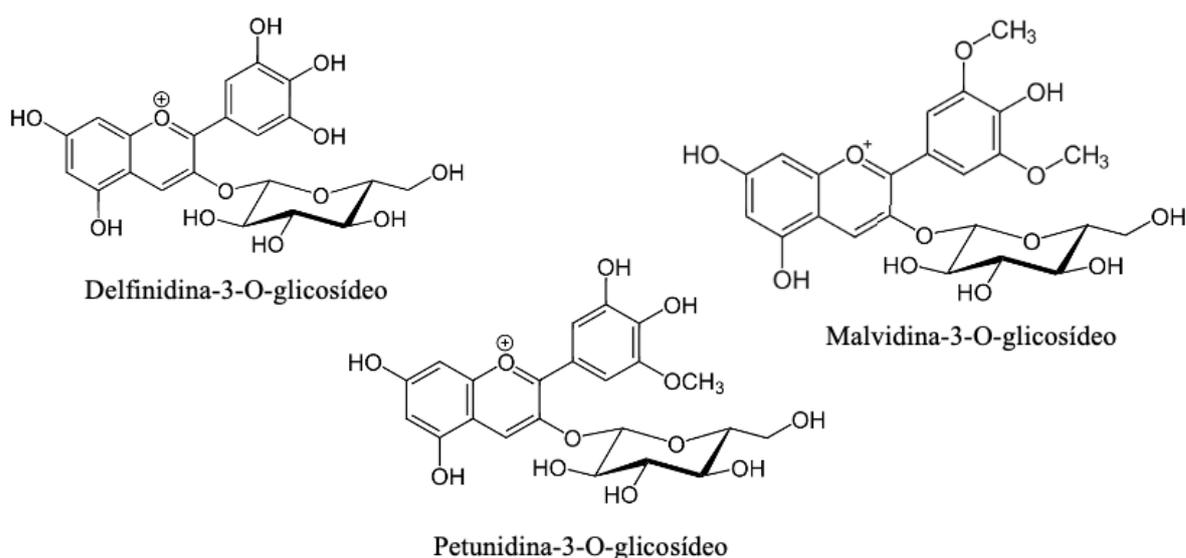
Figura 1 - Estrutura química básica das antocianinas.



Fonte: Mehmood et al., (2021).

Além de frutas e vegetais, algumas sementes também possuem grandes quantidades de antocianinas monoméricas totais (AMT), o feijão preto por exemplo. Estudos mostraram que a quantidade de antocianinas é bastante significativa na extração de tegumento do feijão, tendo uma quantidade de 3,28 mg/g de AMT. As que apresentam os maiores concentrações são delphinidina-3-O-glicosídeo, petunidina-3-O-glicosídeo e malvidina-3-O-glicosídeo, representadas na figura 2 (MADRERA et al., 2020; TEIXEIRA et al., 2021). A proporção de cada uma das antocianinas majoritárias no feijão preto segundo Jun, Shin e Joung (2016) foram de 56% para delphinidina-3-O-glicosídeo, 26% petunidina-3-O-glicosídeo e 18% malvidina-3-O-glicosídeo.

Figura 2 - Estrutura química das antocianinas individuais majoritárias nos tegumentos de feijão.



Fonte: a autora (2021).

Além de serem usadas como corantes para melhorar principalmente os atributos sensoriais dos alimentos. As antocianinas apresentam também benefícios para a saúde devido à sua atividade biológica. Os estudos pré-clínicos e *in vitro* demonstraram que as antocianinas têm o potencial de retardar o progresso de várias doenças crônico-degenerativas devido a sua propriedade antioxidante (ZHU, 2018; BRAGA et al., 2019; FALLAH et al., 2020).

1.3 SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS (DES)

Os solventes comercialmente utilizados não são totalmente eficientes para extrair uma gama de moléculas não polares e polares, o que exige misturas de solventes, condições de alta temperatura-pressão ou então, a busca por solventes alternativos (RENARD, 2018). Isso levou ao desenvolvimento de solventes eutéticos profundos (DES), que são solventes formados por um aceptor de ligação de hidrogênio (HBA) e por um doador de ligação de hidrogênio (HBD) a uma temperatura controlada (LI; ROW, 2016; BENVENUTTI et al., 2020). A temperatura e a proporção de componentes (HBA e HBD) são dois fatores determinantes para um sistema eutético. Esses componentes interagem por meio de forças intermoleculares como a ligação de hidrogênio (SMITH; ABBOTT; RYDER, 2014).

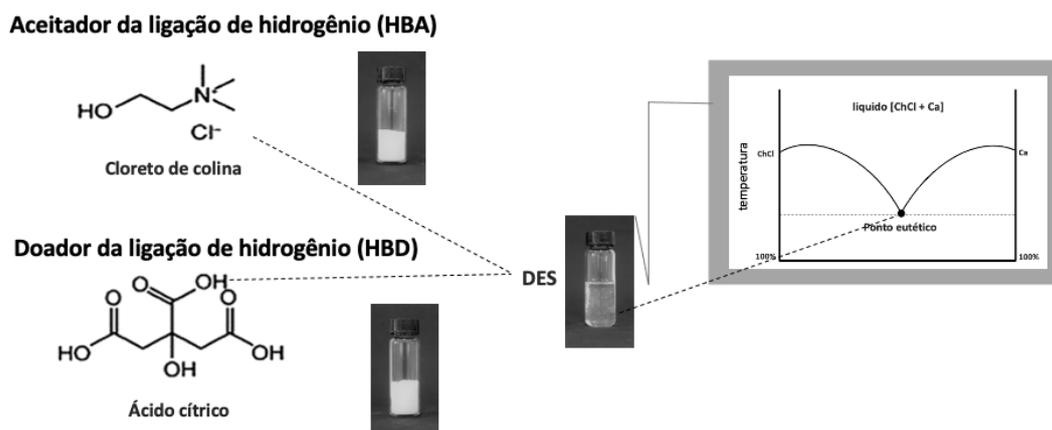
Os DES são misturas de produtos originais prontamente disponível na natureza. Oferecem muitas vantagens, incluindo baixo custo, componentes prontamente disponível, preparação simples e baixa toxicidade (RADOŠEVIĆ et al., 2016). Em todos os campos de pesquisa as propriedades físico-químicas são fundamentais, especialmente um campo relativamente novo como os dos DES. Uma das principais propriedades físico-químicas de interesse dos DES são o comportamento de fase, viscosidade, densidade, pH, pressão de vapor e ligação de hidrogênio (HANSEN et al. 2020).

No comportamento de fase a principal característica para definição de DES é o ponto eutético, que é observado quando o ponto de fusão mais baixo ocorre. Para identificar esse sistema DES alguns conhecimentos são importantes, como a faixa de temperatura e composição da mistura para aplicações específicas. (HAYYAN et al. 2013). A viscosidade do DES está relacionada com a sua composição, podendo ser baixa ou alta, os DES com viscosidade alta dificultam a aplicação, devido sua dificuldade em manusear (MJALLI; MOUSA, 2017).

A densidade também é muito importante a ser identificada, podendo ser modificada dependendo da composição e a razão molar de HBA para HBD. O pH, é outra propriedade indispensável a ser considerada, ele varia dependendo da acidez relativa das espécies que são misturadas, sendo vital o seu conhecimento para aplicações industriais (HANSEN et al. 2020). Outra propriedade fundamental é a pressão de vapor dos DES que quando comparada com as dos solventes convencionais são muito mais baixas (NIKNADDAF et al. 2018; HANSEN et al. 2020). Outra propriedade é ligação de hidrogênio, suspeita de ser a chave da força intermolecular por trás do ponto de fusão que ocorre durante a formação de DES, juntamente com contribuições do par ânion/cátion (HANSEN et al. 2020).

Na Figura 3 é mostrado esquematicamente a formação de DES, tendo como exemplo a utilização do cloreto de colina como HBA e o ácido cítrico como HBD.

Figura 3 - Mistura de cloreto de colina como HBA e o ácido cítrico como HBD para a produção de DES.



Fonte: a autora (2021).

Um ponto importante a ser destacado, é que alguns solventes eutéticos profundos podem ocorrer naturalmente na natureza. De acordo com Smith et al. (2014) os exemplos clássicos são mel e xarope, pois representam misturas de açúcares que também possuem seus pontos eutéticos para se formar. Além do exposto, trabalhos publicados recentemente mostram que os DES podem ser usados com sucesso em combinação de tecnologias emergentes, tornando o processo ambientalmente amigável (IVANOVIĆ et al., 2020). A Tabela 1 apresenta diferentes trabalhos que utilizaram diferentes tipos DES como solvente.

Tabela 1 - Trabalhos utilizando solventes eutéticos profundos (DES) na extração.

Tipo de DES	Matéria-prima	Compostos extraídos	Processo de extração e condições	Concentração de DES	Conclusão do trabalho	Autor
Ácido láctico:glicose	Pétalas de flores (<i>Catharanthus roseus</i>)	Antocianinas	Extração assistida por ultrassom (Frequência de 24 kHz, 30 min, e amplitude de 100%)	100%	Viscosidade do DES escolhido tem papel importante na eficiência da extração. A antocianinas foram muito mais estáveis em DES do que em etanol acidificado	Dai et al., (2016)
Cloreto de colina:ácido cítrico e Cloreto de colina:ácido láctico	Groselha (<i>Ribes nigrum</i> L.)	Antocianinas	Extração assistida por micro-ondas (Relação líquido/sólido 13:1mL/g, temperatura 45 C e tempo 14 min)	80%	Comparando os rendimentos de extração em antocianinas de DES à base de ácidos como HBD foram maiores do que aqueles à base de açúcar	Kou et al., (2019)
Cloreto de colina:ácido cítrico:glicose	Amora (<i>Morus</i>)	Antocianinas	Extração por cavitação (equipamento inventado no laboratório 12.000 rpm, 30 min e pressão de -0,08 MPa)	70%	Comparado com um solvente convencional, o DES apresentou maiores rendimentos e estabilidades na extração de antocianinas	Guo et al., (2019)
Glicose: ácido láctico	Bagaço de cranberry (<i>Vaccinium subg. Oxycoccus</i>)	Antocianinas	Extração assistida por ultrassom (Temperatura de 60 °C, 30 min, e amplitude de 100%)	80%	DES teve maior eficiência de extração e seletividade para antocianinas em comparação com 75% de etanol	Alrugaibah et al., (2021)

Continuação						
Cloreto de colina:glicerol:ácido cítrico	Mirtilo (<i>Vaccinium myrtillus</i>)	Antocianinas	Maceração (0,1 g de pó de amostra para 12 mL de solvente)	75%	O DES rendeu cerca de 76% de antocianinas em comparação a extração com solvente orgânico	Silva et al., (2020)
Cloreto de colina:ácido láctico	Amora (<i>Morus</i>)	Antocianinas	Extração assistida por ultrassom (57,24 ° C, 31,54 min, e 10,76 mL/g)	80%	A estabilidade de antocianinas com DES provaram ter vantagens sobre os solventes tradicionais	Bi et al., (2020)
Cloreto de colina:ácido láctico	Madressilva (<i>Lonicera Caprifolium</i>)	Antocianinas	Extração por cavitação com pressão negativa (-0,08 MPa, razão líquido/sólido de 16 mL/g e temperatura de 53 ° C)	80%	Os extratos de com DES exibiram maior estabilidade de extração do que as de solventes convencionais	Kou et al., (2020)
Cloreto de colina:ácido cítrico	Uva (<i>Vitis vinifera</i> L.)	Antocianinas	Ultrassom simultânea com extração assistida por micro-ondas (Potência a 300 W, US power 50 W por 10 min)	70%	Mostrou que as Antocianinas extraídas com DES em escalas maiores obterão resultados iguais as de escala laboratoriais	Panić et al., (2019)
Cloreto de colina:ácido cítrico	Cenoura preta (<i>Daucus carota subsp. sativus</i>)	Antocianinas	Extração assistida por ultrassom (1:4 de DES adicionadas às amostras por 30 min, frequência 24 kHz, amplitude de 100%.)	100%	O DES resultou em maiores teores de antocianina, além de preservar a cor do extrato de cenoura preta	Türker et al., (2020)

Fonte: a autora (2021).

Segundo Chanioti e Tzia (2018), a combinação dos DES, como solventes verdes, com métodos alternativos inovadores incluindo a extração assistida por ultrassons (UAE) provou ser bastante eficiente para a extração de compostos fenólicos do bagaço de azeitona. Quase todos os DES estudados aumentaram a extração de compostos fenólicos em comparação com os solventes convencionais (etanol aquoso 70% e água). Os DES à base de ácido orgânico, cloreto de colina/ácido cítrico e cloreto de colina/ácido láctico, foram eleitos como solventes mais promissores e provaram ser mais eficaz na extração de compostos fenólicos de bagaço de azeitona em comparação com os solventes convencionais.

Estudo para a extração de isoflavonas da soja também mostrou que cloreto de colina/ácido cítrico foi o mais eficaz quando comparado com dezessete sistemas de DES diferentes, cada um incluindo dois ou três componentes. A análise multivariada de dados revelou que o DES baseado em uma solução de cloreto de colina/ácido cítrico a 30% (razão molar de 1:1) são os sistemas mais eficazes para a extração de isoflavonas de produtos de soja (BAJKACZ e ADAMEK, 2017).

De acordo com GUO et al. (2019), obteve fortes evidências da capacidade de extração e capacidade de estabilização da antocianina com DES à base de ácido. O DES à base de ácido apresenta como uma ótima alternativa para extração ecológica, podendo ser muito utilizado na extração, sendo um benefício para a indústrias farmacêutica e alimentícia.

1.4 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

A extração tem sido usada provavelmente desde a descoberta do fogo para perfumes, cosméticos e alimentos. Nas linhas de produção, poucos são os processos de extração que não utilizem os métodos de maceração, extração por solvente, vapor, prensagem a frio e compressão (CHEMAT et al., 2017; SILVA et al, 2017). No entanto, o aumento dos custos de energia e o esforço para reduzir as emissões de gases de efeito estufa, fizeram com que as indústrias alimentícias, farmacêuticas, cosméticas entre outras, buscassem novas tecnologias para reduzir esse consumo. Assim, novas técnicas de extração aprimoradas e eficientes foram desenvolvidas, afim de atender essas deficiências, como extração assistida por ultrassom (UAE), extração por altas pressões, entre outras (CHEMAT et al., 2017; WANG et al, 2018 CHEN et al., 2007).

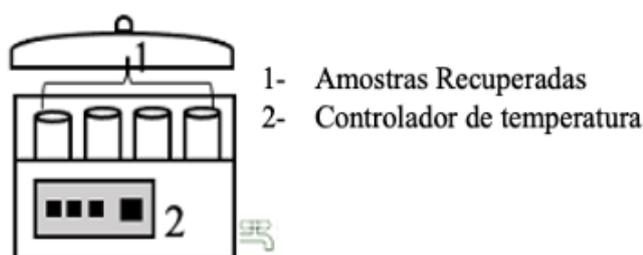
1.4.1 Extração por maceração (ME)

A extração de antocianinas é um processo delicado devido à sua baixa estabilidade. No entanto, a aplicação de calor a um processo de extração é importante para promover fenômenos de transferência de massa, o que aumenta eficiência do processo (ALBUQUERQUE et al, 2020). Estudos mostram que o processo de maceração é o mais utilizado para a extração das antocianinas em feijão (TEIXEIRA et al., 2021; MOJICA et al., 2015; MOJICA; BERHOW; GONZALEZ DE MEJIA, 2017).

O processo convencional por maceração é um método de extração que pode ser realizado em temperaturas mais baixas e temperatura ambiente, possuindo essas características como vantagem em relação as antocianinas. Entretanto, é um processo bastante demorado, podendo durar entre três horas à três semanas. Esse método também é inviável devido ao baixo rendimento, grande quantidade de material vegetal, alto consumo de solvente e impacto ambiental. (CAVALCANTI, 2013; JOVANOVIĆ et al, 2017).

A maceração é uma técnica de extração que ocorre por difusão, onde os solventes são utilizados de acordo com sua polaridade para extrair os compostos de interesse. Em geral, ocorre a saturação do solvente de extração ou um equilíbrio difusional entre o solvente e a célula vegetal, podendo ser em temperatura controlada ou temperatura ambiente (Figura 4). Esta técnica é um dos métodos de extração mais utilizados devido à sua adequação a diferentes escalas, simplicidade e baixo custo em comparação com outros métodos (SILVA et al, 2017).

Figura 4 - Diagrama da unidade de extração por maceração (Banho).



Fonte: a autora (2021).

Em geral, a extração de um soluto de partículas porosas para a maior parte do solvente durante um processo de difusão envolve várias etapas, como a difusão de solvente no sólido poroso, dissolução do soluto no solvente, difusão de soluto dissolvido para a superfície da partícula e difusão de soluto dissolvido da superfície da partícula para o solvente (SETFORD

et al, 2017). Além do método de extração a escolha do solvente é muito importante para uma melhor e mais rápida extração. Pensando nisso, alternativas verdes e eficientes como a utilização de DES na extração vêm surgindo, apresentando resultados propícios quando comparada com solventes convencionais. Estudo realizado por Bubalo et al, (2016), mostrou que os rendimentos de compostos fenólicos do tegumento da uva obtidos com os DES foram superiores aos obtidos com água e solvente convencional utilizando o processo de ME (BUBALO et al, 2016).

1.4.2 Extração por água subcrítica (SWE)

A extração em água subcrítica (SWE), é uma técnica que utiliza água superaquecida como solvente, em pressão suficiente para manter a mesma no estado líquido. Tem sido muito usada para extrair compostos bioativos, como resíduos de vinícola, antocianinas de tegumento de uva vermelha, catequinas de folhas de chá, entre outros (WANG et al, 2018, GARCÍA et al, 2006; JU; PIÑEIRO; PALMA; BARROSO 2004).

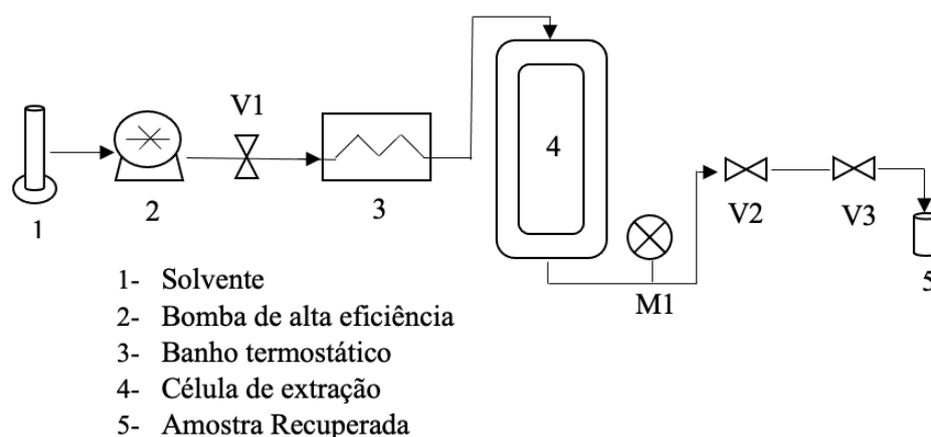
O método de extração subcrítico usa principalmente água a temperaturas aproximadamente acima de 90 °C e abaixo de 370 °C e em pressão acima da atmosférica para mantê-lo em estado líquido. Essas condições do solvente potencializam as características de difusão e solubilidade dos analitos, além de diminuir a viscosidade e a tensão superficial do solvente, o que facilita a penetração na matriz sólida, aumentando a área de contato e a taxa de transferência de massa. É um método ambientalmente correto e uma extração rápida, que alcança rendimentos de extração de compostos de média e alta polaridade contidos em uma matriz sólida (HERRERO et al., 2013; MUFARI et al, 2020).

No entanto, também existem algumas desvantagens como a utilização de altas temperaturas não sendo adequado para a extração de alguns compostos sensíveis ao calor, podendo resultar em degradação térmica. Além disso, a água em estado subcrítico pode ser mais reativa e corrosiva do que a água em condições ambientais, uma vez que a água neste estado pode catalisar ou acelerar a hidrólise e oxidação de alguns compostos (TEO et al., 2010; ZHANG et al, 2020).

A extração subcrítica pode ser realizada por duas formas, processo dinâmico ou estático no equipamento (Figura 5). O processo estático é composto por um ou vários ciclos onde o solvente preenche o extrator, permanecendo em contato com a amostra durante um tempo pré-determinado. No processo dinâmico, o solvente é bombeado continuamente pela célula extratora, mantendo uma vazão constante e a válvula de saída aberta para coleta do extrato. A

extração dinâmica é mais eficiente que a estática, por evitar a saturação do solvente, enquanto que a extração estática permite maior penetração do solvente nos nano e micro poros da matriz devido ao maior tempo de contato entre as fases (HALL, 2018; NIETO et al 2010).

Figura 5 - Diagrama da unidade de extração por água subcrítica.



Fonte: a autora (2021).

A unidade utilizada para a extração por água subcrítica nesse trabalho é representada na figura 5, sendo composta por uma bomba de alta eficiência (2) (Waters 515 HPLC, MA – EUA) que é responsável pelo envio do solvente (1) até a célula de extração encamisada (4), com temperatura controlada através de um banho termostático (3) (Microquímica, MQBMP 99-20, Palhoça, Brasil).

Na tentativa de recuperar compostos fenólicos de subprodutos uva (bagaço), uma nova metodologia foi implementada. A extração de água subcrítica foi realizada com o uso de solventes emergentes conhecidos como solventes eutéctico profundo (DES). A técnica de extração de água subcrítica utilizada foi a de temperatura de extração de 100 °C ideal para o isolamento de compostos fenólicos, e água subcrítica combinado com 30% de DES (colina cloreto/ureia). Essas condições levaram um aumento significativo de compostos fenólicos, quantidades maiores quando comparado com apenas água subcrítica (LOARCE et al, 2020).

1.4.3 Extração assistida por ultrassom (UAE)

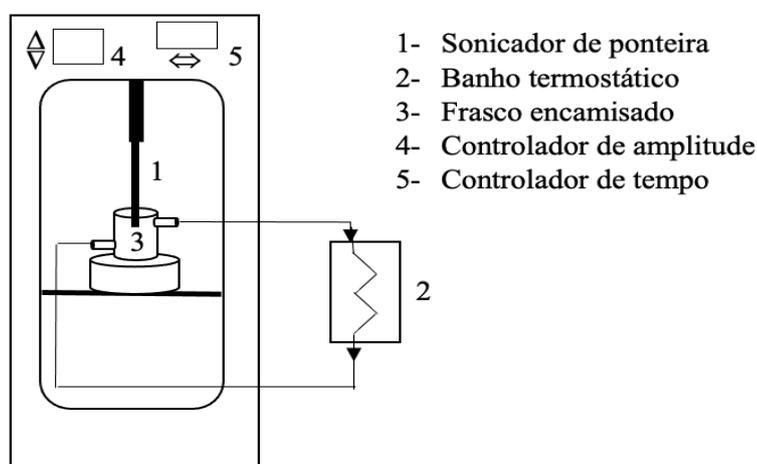
No processamento de alimentos, as ondas ultrassônicas podem ser divididas em duas categorias com base na diferença de intensidade e frequência do som. O ultrassom de alta frequência (frequências de 2 a 20 MHz), é empregado em análises de qualidade de alimentos, imagens médicas e inspeção não destrutiva. O ultrassom de alta intensidade que opera em

frequências mais baixas (frequências 20 a 100 kHz), é usado para aprimorar o processo de extração de compostos bioativos (BIMAKR et al., 2017).

A extração assistida por ultrassom (UAE) é um tópico de pesquisa que afeta vários campos da química moderna baseada em plantas. Muitas aplicações relatadas mostraram que a extração assistida por ultrassom é uma alternativa verde e economicamente viável às técnicas convencionais de alimentos e produtos naturais. Tendo vários benefícios como, transferência mais rápida de massa diminuindo assim o tempo de extração, temperatura reduzida, extração seletiva, baixo consumo de solventes, baixo custo de instalação e facilidade durante a operação (CHEMAT; KHAN, 2011; CHEMAT et al., 2017). Como desvantagem, apresenta aquecimento não homogêneo na extração (LIANFU; ZELONG, 2008).

A frequência do ultrassom na extração é eficiente devido a quebra da micela ou matriz da amostra facilitando o acesso do solvente aos compostos hidrofóbicos contidos. Além disso, o poder do ultrassom agita o solvente de extração (Figura 6), aumentando assim o contato entre o solvente e os compostos direcionados, melhorando significativamente essa eficiência da extração (CHEN et al., 2007).

Figura 6 - Diagrama do sistema de extração por sonda ultrassônica.

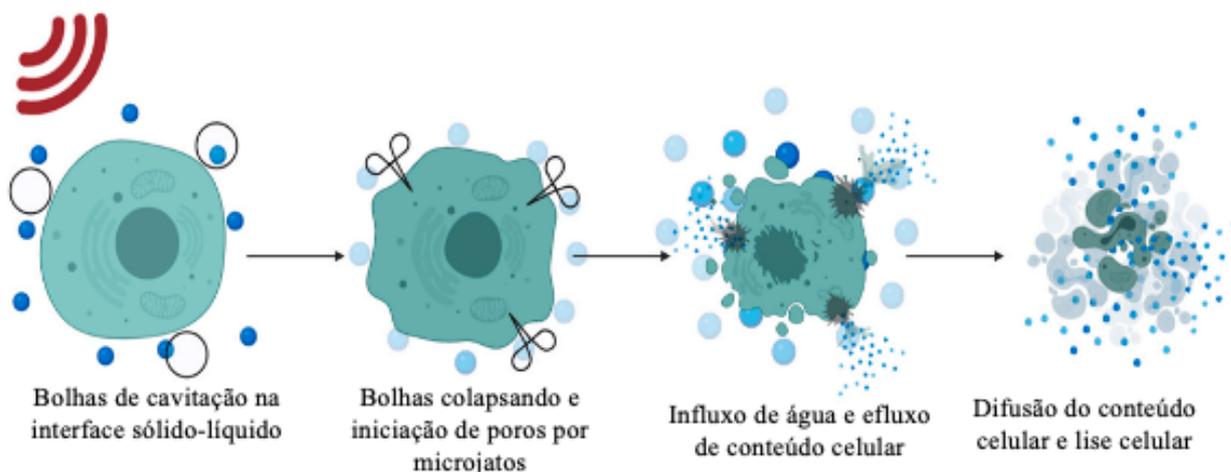


Fonte: a autora (2021).

Esse processo pode ser usado de forma eficaz para melhorar a extração, visto que aumenta a transferência de massa e resulta em possível suspensão da parede celular. Esse mecanismo de ruptura da parede celular ocorre quando a implosão de bolhas de cavitação gera micro turbulência, colisões de alta velocidade entre as partículas e difusão interna (Figura 7). Devido ao espaço limitado para as bolhas se expandirem, a maioria entra em colapso

assimétrico resultando em correntes de circulação significativa de líquido, juntamente com intensa turbulência (SHIRSATH et al., 2017; PERERA; ALZHRANI, 2021).

Figura 7 - Diagrama esquemático da lise celular causada por bolhas de cavitação.



Fonte: PERERA e ALZHRANI (2021).

Métodos de extração assistida por calor e ultrassom foram aplicados para recuperar antocianinas de *Hibiscus sabdariffa*. A extração utilizando ultrassom foi aproximadamente 2,5 vezes mais eficiente, permitindo recuperar uma grande quantidade de antocianinas, valores elevados quando comparado com a literatura. Estes resultados, podem ser usados como fonte viável de antocianinas para produzir corantes a base biológica (PINELA et al., 2019).

Para estabelecer métodos de extração ecológicos para as antocianinas, DES foram investigados como uma alternativa verde aos solventes convencionais, juntamente com extração assistida por ultrassom de alta eficiência. Esta abordagem usa os DES como solvente verde e ultrassom como alternativa representando uma boa escolha para projetar métodos de extração ecológicos para compostos fenólicos de várias fontes (BOSILJKOV et al., 2017). Para tornar os processos de extrações cada vez mais eficientes, trabalhos combinados estão sendo realizados, como tecnologias não convencionais (UAE e SWE) e solventes alternativos (DES), pois além de obter uma melhor extração reduz os danos ambientais (IVANOVIĆ, et al., 2020).

1.5 OTIMIZAÇÃO POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR)

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) é uma ferramenta estatística e matemática usada para otimização de processos que envolve as respostas a serem otimizadas, com base nos parâmetros do processo. É uma ferramenta de otimização vital, usada em várias aplicações de engenharia (NAZGHELICHI; AGHBASHLO; KIANMEHR, 2011 AGU et al.,

2020). A principal vantagem da MSR está na redução do número de testes, tornando menos experimentos e reduzindo o custo geral da pesquisa (YUAN, et al., 2019; TILAY et al., 2010).

A MSR também tem como objetivo descrever o comportamento dos dados experimentais e fazer previsões estatisticamente válidas. Ao aplicar esse procedimento (MSR) deve-se reconhecer dois tipos de variáveis envolvidas, as variáveis independentes (os fatores) e as variáveis dependentes (as respostas). Além de reconhecer deve-se analisar a relevância estatística destes fatores e para isso modelos matemáticos são utilizados, visto que, alguns ensaios de extração apresentam certas complexidades (FERREIRA et al., 2007; NOVAES et al., 2017; ONOJI, et al., 2019).

Em ensaios complexos de extração a primeira etapa para a otimização multivariada é a combinação dos fatores, por meio de um planejamento fatorial completo ou fracionado. Uma ferramenta para otimização que vem sendo amplamente utilizado em processos de extração, é o planejamento fatorial fracionado de três níveis fornecendo 15 experimentos, proposto por Box-Behnken (ALBERTI et al., 2014; CALLAO, 2014; FERREIRA et al., 2007; HADIDI; IBARZ; PAGAN, 2020). O Projeto Box-Behnken (PBB) quando comparada com composto central ou fatorial completo com três níveis torna-se mais eficiente. Isso porque, o projeto não possui pontos axiais, permitindo que todos os pontos do experimento caiam dentro de uma zona de operação confiável. Assim, sua execução é com o mesmo número de fatores e menos dispendiosa (FERREIRA et al., 2007; WANG; LIU; HU, 2014; HADIDI; IBARZ; PAGAN, 2020).

Segundo Huang, et al. (2019), o planejamento Box-Behnken (BBD), com 3 níveis e 4 fatores, mostrou ser bastante adequado para obter as melhores condições de extração de antocianinas e compostos fenólicos presentes na batata doce roxa. Essa metodologia tem sido amplamente investigada para analisar e otimizar os parâmetros que influenciam o rendimento da extração. Além da utilização em alimentos, em especial na extração de compostos bioativos, também é bastante empregada em outras áreas, como na agricultura, biologia, química e outros campos (ASHENGROPH; NAHVI; AMINI, 2013; BELHACHAT et al., 2018).

1.6 ESTABILIDADE DOS EXTRATOS COM DES

Devido as antocianinas terem uma baixa estabilidade, é sempre um desafio sua extração, armazenamento e seu uso como corantes naturais em alimentos. Estudos feito por Dai et al. (2014), mostraram que após a alta extração de antocianina com DES, a degradação em comparação com extração utilizando solventes convencionais, foi desacelerada. Mostrando

fortes evidências sobre a capacidade de extração e capacidade de estabilização da antocianina, com DES à base de ácidos e açúcares. A alta capacidade de estabilização dos DES está correlacionada com as fortes interações de ligações de hidrogênio entre os solutos e moléculas de solvente. Os DES são como cristais líquidos em que o pigmento das moléculas é fixado nos cristais (GUO et al., 2019).

Os DES lançam uma nova luz sobre a capacidade estabilizadora para compostos fenólicos. Mostrando que alguns DES são melhores solventes para a estabilização de compostos fenólicos do que os solventes em geral, melhorando sua estabilidade sob diversas condições, como alta temperatura, luz e tempo de armazenamento. Além disso, a maior estabilidade da cor e dos compostos fenólicos no extrato de cártamo, foram observados em extratos com DES quando exposto à luz solar em condições ambientais (Dai et al, 2014).

A estabilidade dos antioxidantes dos resíduos de frutas de *Mangifera pajang* foi aprimorada usando DES (cloreto de colina/ácido ascórbico), visto que esse solvente possui efeito protetor e auxilia no prolongamento da meia-vida. Com essas observações, foi possível concluir que o DES aumentou significativamente a estabilidade dos compostos antioxidantes. O bom desempenho do DES demonstra grande promessa de ser utilizado em várias matrizes alimentares (LING et al, 2020).

Assim como descrito nos trabalhos supracitados, Bi et al, (2020) também salienta que os DES à base de cloreto de colina em combinação com ácidos oferecem vantagens notáveis sobre solventes tradicionais. Nesse estudo, o tempo de meia-vida foi melhorado e o tempo de armazenamento prolongado para as antocianinas. Quando na extração foi utilizado cloreto de colina/ácido láctico, demonstrando superioridade dos DES na técnica de extração sobre os solventes convencionais, o que pode ser atribuído à forte e ampla ligação de hidrogênio, formada entre o componente DES com soluto.

1.7 CRIOCONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS

A concentração é normalmente realizada por processos de evaporação a vácuo em vários estágios, nos quais a água é retirada em altas temperaturas (ONSEKIZOGLU; BAHCECI; ACAR, 2010). Como as antocianinas degradam-se com facilidade durante o processamento e armazenamento de alimentos, sendo altamente sensíveis a fatores como temperatura, luz, pH, presença de oxigênio e enzimas, técnicas alternativas de concentração para a obtenção de produtos estáveis estão sendo estudadas, como os processos de membrana e concentração por congelamento (crioconcentração) (KONCZAK; ZHANG, 2004; MERCALI et al. 2013).

Porém, processos de membranas apresentam limites que estão relacionados principalmente ao seu rompimento devido à alta pressão necessária para realizar a filtração da solução concentrada. A obstrução da membrana e a deterioração da integridade também são desvantagens no seu uso (AIDER; HALLEUX, 2008; PETZOLD et al. 2015; SAFIEI; ALAUDIN et al. 2020).

Em comparação com essas técnicas de evaporação e tecnologia de separação por membranas, a concentração por congelamento tem vantagens potenciais significativas para a produção de um concentrado com alta qualidade, pois o processo ocorre em baixas temperaturas. Além de ser ecologicamente correta, tem alta eficácia e preserva as qualidades nutricionais dos extratos (PETZOLD et al., 2015). Esse processo consiste, na remoção de água, através do cristal de gelo formado durante o processo de resfriamento, esses são removidos e separados do fluido junto ao concentrado que não se congela. Nessa técnica, duas fases são obtidas quando a temperatura de uma solução aquosa é abaixo do ponto de congelamento, que são a fase líquida e a sólida. A fase líquida possui maior concentração de soluto do que a solução inicial, enquanto a fase sólida é composta na maior parte de água pura com alguns solutos presos (SAFIEI; ALAUDIN et al. 2020).

Segundo Palma et al., (2017) a aplicação da concentração por congelamento para um suco de mirtilo foi eficiente, aumentando significativamente o conteúdo de sólidos e de compostos fenólicos da fração concentrada em comparação com o valor inicial. Do ponto de vista prático, a concentração pelo processo de congelamento é uma técnica eficaz para proteger os polifenóis de um suco de mirtilo, pois obtém concentrados com propriedades atraentes. Jaster et al. (2018) também mostrou que a crioconcentração é uma excelente alternativa para a concentração do suco de morango, podendo ser aplicada em bebidas lácteas com um alto teor nutricional. O crioconcentrado de morango a 30% apresentou ser um produto com alto teor de antocianinas e atividade antioxidante. Além disso, o produto demonstrou ótimos parâmetros de cor, quando comparado a duas marcas comerciais que utilizam corantes artificiais.

Além do processo de crioconcentração, que aprimora os parâmetros de cor dos extratos/sucos concentrados, os DES (solvente utilizado na extração) também contribuem com essa propriedade, melhorando a estabilidade dos compostos (DAI et al., 2014). Visto que os DES além de serem excelentes solventes não precisam ser removidos do processo de crioconcentração. Pois estudo com mirtilo mostrou que associado aos compostos extraídos o cloreto de colina/glicerol/ácido (DES utilizado no trabalho) apresentou efeitos gastroprotetores. Na investigação, pode-se comprovar esses efeitos gastroprotetores do solvente

utilizado para extrair as antocianinas presentes no mirtilo aplicado em um modelo de úlcera gástrica induzida em ratos (SILVA et al, 2020).

1.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Matérias primas de origem vegetal são fontes ricas de compostos bioativos, como as antocianinas extraídas do tegumento de feijão, que podem ser usadas para uma variedade de aplicações. Por esse motivo há a necessidade de desenvolver métodos que melhorem a recuperação desses compostos, e um grande desafio é escolher o mais eficiente, juntamente com os solventes a serem utilizados e técnicas para concentração de extrato, visto que, cada método possui sua especificidade, vantagens e desvantagens. A extração com água subcrítica, por exemplo, é um método ambientalmente correto e tem como ponto positivo a rápida extração, e como negativo, a utilização de altas temperaturas resultando em degradação térmica. Já a ultrassom, também é um método bastante eficiente, tendo como benefício a utilização de pouca matéria-prima e rápida extração, e como desvantagem o aquecimento não homogêneo no processo. Assim, este estudo avaliou as técnicas de extração para encontrar o melhor procedimento, preservando a cor e os compostos presentes nas matérias-primas, evitando a degradação para uma aplicação eficiente.

CAPÍTULO 2

EFEITO DA ADIÇÃO DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS EM ÁGUA: UM ESTUDO DE CASO PARA A EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS A ALTA PRESSÃO

2.1 INTRODUÇÃO

Novas estratégias estão sendo desenvolvidas para aumentar a sustentabilidade da cadeia alimentar. Entre elas, a valorização de subprodutos ou resíduos agroindustriais, de baixo valor de mercado, pois esse aproveitamento, além de contribuir para redução de danos ambientais, pode possibilitar a recuperação de compostos de alto valor agregado. Estes compostos são especialmente relevantes no caso de subprodutos de frutas e vegetais, uma vez que são caracterizados por uma elevada carga de compostos bioativos com potenciais benefícios à saúde devido aos seus efeitos antioxidantes, antimicrobianos e anti-inflamatórios (LOARCE et al., 2020; DZAH et al., 2020).

O feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma semente com valor econômico amplamente cultivada e consumida mundialmente. Porém, nas etapas de colheita e processamento em mesa separadora densimétrica, os grãos se quebram devido a danos mecânicos, gerando uma quantidade importante de co-produto de baixo valor comercial. Os tegumentos representam 15% dos grãos quebrados e contêm a maior concentração de compostos fenólicos como as antocianinas. Portanto, este subproduto se transforma em uma excelente fonte natural de compostos bioativos (BRASIL, 2012; TEIXEIRA et al., 2021).

A recuperação dos compostos de interesse deve ser realizada por meio de técnicas de extração. A extração com água subcrítica (SWE) é uma técnica promissora que combina os efeitos de alta pressão e alta temperatura, utilizando a água como solvente de extração no estado líquido acima da sua temperatura de ebulição. Sob essas condições subcríticas, a polaridade e a constante dielétrica da água diminuem até valores comparáveis às de solventes orgânicos. No entanto, aspectos importantes devem ser considerados, associados com as condições de processo, como o risco de degradação dos compostos e outras reações potenciais, como hidrólise, caramelização e reações de Maillard podem levar a resultados errôneos (PINTO; LANÇAS, 2010; PLAZA e TURNER, 2015; LOARCE et al., 2020).

Além do método de extração SWE, que torna mais rápida a extração de antocianinas quando comparado com os métodos convencionais, destaca-se também o uso de solvente eutéticos profundos (DES), compostos por um aceptor de ligação de hidrogênio (HBA) e por um doador de ligação de hidrogênio (HBD) a uma temperatura determinada. Os DES, adicionados à água subcrítica, podem contribuir para a eficiência de extração, além de serem adequados para aplicação em produtos farmacêuticos e alimentícios (TÜRKER e DOĞAN, 2020; LI; ROW, 2016; BENVENUTTI et al., 2020). Desta forma, o objetivo deste capítulo foi

avaliar o efeito da adição de DES na água em estado subcrítico para a extração de antocianinas do tegumento do feijão preto com baixo valor de mercado.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os feijões pretos quebrados (*Phaseolus vulgaris* L.), “bandinhas”, foram obtidos de indústrias beneficiadoras da cidade de Ponta Grossa, Paraná (Brasil) em 2019. A mesma amostra foi utilizada em todos os procedimentos experimentais para garantir a representatividade. Os reagentes, Folin-Ciocalteu, trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetremetricroman-2-carboxílico), DPPH (1, 1-difenil-2-picril-hidrazil), ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)), foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Todos os outros reagentes usados para as análises foram de grau analítico.

2.2.1 Preparação de material vegetal

Após as amostras serem recebidas, essas foram selecionadas e em seguida hidratadas (1:4 m/v) a 4 °C por 2 h para facilitar a separação manual dos tegumentos nos cotilédones. Após a remoção dos tegumentos, estes foram colocados em bandejas e secas em estufa com circulação de ar forçada (DeLeo, Porto Alegre, Brasil) a 60 °C por 17 h. Os tegumentos foram triturados em moinho de facas, tipo Willey (DeLeo, Porto Alegre, Brasil), e a análise granulométrica das partículas foi realizada usando o jogo de peneiras, com aberturas de 6 a 48 *mesh*, da série Tyler (W.S. Tyler, Wheeling, EUA). A amostra destinada para o processo de extração foi com tamanho de partícula entre 20 a 32 *mesh*.

2.2.2 Determinação do teor de umidade

Para a determinação do teor de umidade dos tegumentos das “bandinhas” foram pesadas 5 g de amostra em cadinhos previamente tarados em balança analítica (Shimadzu, AY220, São Paulo, Brasil) e colocadas na estufa (DeLeo, Porto Alegre, Brasil) a 105 °C durante 3 h. Após esse tempo, os cadinhos foram colocados no dessecador para resfriar e em seguida pesados. Essas etapas de aquecimento, resfriamento e pesagem foram repetidas até obtenção de peso constante. O procedimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em base seca (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

2.2.3 Preparação, caracterização e seleção dos solventes

Diferentes proporções molares, dos compostos HBA e HBD, foram usadas para a produção dos solventes eutéticos profundos (DES) (Tabela 2). Os dois componentes utilizados para cada DES (doador e o receptor de ligação de hidrogênio) foram misturados em proporções específicas, e depois colocados em banho com temperatura controladas de 80 °C sob agitação até a formação de um líquido homogêneo e transparente (BUBALO et al., 2016).

A partir de uma triagem preliminar de 5 diferentes DES, uma combinação e concentração foi selecionada, considerando desempenho do DES formado para a extração do composto de interesse, além de aspectos como as propriedades físico-químicas e a estabilidade dos compostos recuperados (no presente estudo as antocianinas) e também o custo envolvido na preparação dos DES. Esses dados estão apresentados na tabela 2, onde os valores de pH foram medidos em triplicata, por leitura direta em pHmetro de bancada (KASVI, modelo K39-2014B, PR, Brasil) calibrado com solução tampão pH 4,01, 7,01 e 10,01 (AOAC, 2016).

O teste preliminar de seleção dos DES consistiu em adicionar os solventes preparados em água, em diferentes proporções (15, 10, 5 e 1% (v / v)), para então ser empregado no processo de extração de antocianina dos tegumentos de feijão. O procedimento de extração por maceração consistiu na aplicação do DES em água, em diferentes proporções em um banho equipado com controle digital de temperatura, mantida a temperatura constante (60 °C) por 60 min. Razões sólido-líquido de 0,02 g do tegumento de feijão por mL de solvente preparado. Os extratos foram então centrifugados por 10 min e o sobrenadante foi coletado e ajustado para um volume final de 10 mL e armazenado até que análise de antocianinas fossem realizadas.

Tabela 2 - Propriedades dos DES.

Solvente eutético profundo natural	Abreviação (HBA:HBD)	Relação molar	Preço (R\$/L)	pH
Cloreto de colina:Ácido cítrico	ChCl:Ca	(1:1)	346,445	0,77
Cloreto de colina:Propanodiol	ChCl:Pro	(1:2)	250,8	4,01
Cloreto de colina:Ácido málico	ChCl:Ma	(1:1)	351,94	0,99
Cloreto de colina:Ácido láctico	ChCl:La	(1:1)	372,54	1,35
Ácido láctico:Propanodiol	La:Pro	(1:1)	48,44	1,36

HBA: acceptor de ligação de hidrogênio; HBD: doador de ligação de hidrogênio. Fonte: a autora (2021).

2.2.4 Projeto de triagem para SWE

Para o método de água subcrítica (SWE), foi realizado uma cinética, com o intuito determinar o tempo necessário de extração, utilizando os pontos centrais das variáveis independentes do planejamento fatorial completo (vazão 4 mL/min, temperatura 110 °C e concentração do solvente 5%). Os fatores das variáveis foram atribuídos por revisão de artigos anteriores incluindo, vazão, temperatura e concentração do solvente (PETERSSON et al., 2010; WANG et al., 2018, GARCÍA et al., 2006; JU; HOWARD 2003, PIÑEIRO; PALMA; BARROSO 2004; HERRERO et al., 2013). Dez extratos foram gerados a partir do método para localizar um tempo ideal para o estudo.

2.2.5 Otimização de extração por SWE

A extração por água subcrítica (SWE) é uma técnica de extração rápida que alcança rendimentos de compostos de média e alta polaridade. Os experimentos do tegumento de feijão extraídos por SWE foram realizados em modo dinâmico, utilizando como solvente a água subcrítica enriquecida de DES. As extrações foram realizadas em pressão constante de 100 bar, variando as condições de temperatura, vazão da mistura solvente e concentração de DES na mistura, de acordo com a combinação de variáveis geradas pelo delineamento experimental Box-Behnken (BOX e BEHNKEN, 1960), com um total de 15 experimentos aleatórios (Tabela 3).

Tabela 3 - Planejamento fatorial Box-Benhken.

Ensaio	Variáveis codificadas e valores reais		
	Temperatura (°C)	Vazão (mL/min)	Concentração (%)
1	0(110)	-1(3)	+1(9)
2	+1(130)	+1(5)	0(5)
3	0(110)	-1(3)	-1(1)
4	-1(90)	0(4)	-1(1)
5	+1(130)	0(4)	+1(9)
6	0(110)	0(4)	0(5)
7	0(110)	+1(5)	-1(1)
8	-1(90)	0(4)	+1(9)
9	0(110)	0(4)	0(5)
10	+1(130)	-1(3)	0(5)
11	0(110)	0(4)	0(5)
12	+1(130)	0(4)	-1(1)
13	0(110)	+1(5)	+1(9)
14	-1(90)	+1(5)	0(5)
15	-1(90)	-1(3)	0(5)

Fonte: a autora (2021).

Para os ensaios de SWE, 1,5 g de tegumento de feijão preto seco e moído foi adicionado na célula extratora e a extração foi conduzida por um tempo de 10 min (tempo definido por testes preliminares seção 2.2.4). As combinações dos fatores foram avaliadas segundo o planejamento fatorial, onde três variáveis foram empregadas, temperatura, variando de 90 a 130 °C (X1), vazão, de 3 a 5 mL/min (X2) e concentração de DES (cloreto de colina:ácido cítrico), de 1 a 9% (X3) em três níveis, conforme mostrado na Tabela 3. Os extratos obtidos a partir da SWE foram armazenados em frascos âmbar até análises posteriores de determinação de teor de antocianinas manoméricas totais (AMT), teores de fenólicos totais (CFT) e capacidade antioxidante *in vitro* medida por ABTS e DPPH.

Com as respostas, uma análise de regressão múltipla foi realizada para o ajuste dos dados experimentais, por meio do modelo polinomial de segunda ordem (BRUNS; SCARMINO; BARROS, 2006), como pode ser observado na equação generalizada a seguir.

$$Y_n(x) = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i<j=1}^3 \beta_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

Sendo y a resposta predita, β_0 , β_i , β_{ii} e β_{ij} os coeficientes de regressão intercepto linear, quadrático e interação de termos, respectivamente, e x_i e x_{ij} , são as variáveis independentes. As variáveis independentes avaliadas foram x_1 : temperatura, x_2 : vazão e x_3 : concentração de solvente.

Na equação de regressão foram estudadas as significância estatística das variáveis por meio do teste ANOVA e os termos não-significativos foram removidos do modelo e reajustados os dados apenas com os parâmetros significativos ($p < 0,05$). A qualidade dos ajustes dos modelos foi avaliada por meio do p-valor, coeficiente de regressão (R^2) e seu respectivo R^2 ajustado. Após essa avaliação foi realizada a construção das superfícies de respostas. E assim, realizada a função de desejabilidade, condição ótima simultânea para maximizar o teor de antocianinas monoméricas totais, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS (DERRINGER; SUICH, 1980).

Além da função de desejabilidade foi feito uma validação externa do modelo para verificar, por meio da repetição do processo SWE, utilizando as condições ótimas encontradas com a análise dos resultados do plano Box-Behnken. Os valores experimentais de cada variável resposta foram determinados e comparados com os resultados preditos, no intervalo de confiança ao nível de 95 % para verificar o poder de predição do modelo.

2.2.6 Avaliação de antocianinas monoméricas totais (AMT)

A concentração de antocianinas monoméricas totais (AMT) foi determinada conforme a metodologia do pH diferencial (GIUSTI; WROLSTAD, 2001). Para isto foi preparado soluções tampão de cloreto de potássio pH 1,0 (0,025 mol.L⁻¹) e de acetato de sódio pH 4,5 (0,4 mol.L⁻¹). As análises foram realizadas em microplacas, onde foram adicionadas 20 μ L de amostra de extrato para 280 μ L de solução tampão com pH 1,0 e pH 4,5, essas foram agitadas e em seguida lidas as absorbâncias à 520 e 700 nm em leitora de microplacas (Multileader Infinite M200 TECAN, ZH, Switzerland). A equação a seguir representa o cálculo das antocianinas monoméricas totais expresso em mg de cianidina-3-O-glicosídeo por g de amostra seca.

$$AMT = \frac{(Abs * PM * FD * 10^3)}{\varepsilon * l} \quad (2)$$

Onde, Abs = (Abs_{520 nm} - Abs_{700 nm}) pH 1,0 - (Abs_{520 nm} - Abs_{700 nm}) pH 4,5; PM = peso molecular: 449,2 g.mol⁻¹ para cianidina-3-O-glicosídeo; FD = fator de diluição estabelecido: 15; ε = coeficiente de extinção molar: 26900 L.mol⁻¹.cm⁻¹ para cianidina-3-O - glicosídeo; 10³ = fator de conversão de g para mg.

2.2.7 Determinação da capacidade antioxidante *in vitro* por DPPH e ABTS

Para a determinação da capacidade antioxidante (AA) por DPPH foi utilizado o método de captura do radical livre (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER; BERSET, 1995). Em microplacas, foi adicionado 50 μ L do extrato diluído (1:50) e 250 μ L da solução DPPH (125 μ mol.L⁻¹) preparada em metanol. Após 30 min de reação no escuro, foi feita a leitura a 517 nm no leitor de microplacas (Multileader Infinite M200 TECAN, ZH, Switzerland). Para quantificar a capacidade de antioxidante foram comparadas as absorvâncias com uma curva padrão de calibração.

Para cada amostra de extrato foi calculada a atividade antioxidante pelo percentual de redução e os resultados foram expressos em μ mol equivalente de trolox (ET) por g de material seco (μ mol ET g⁻¹ tegumento de feijão seca), como pode ser observado na Equação 3.

$$Atividade\ antioxidante\ (\% \text{ inibição}) = \left[1 - \left(\frac{Abs\ amostra\ 517nm}{Abs\ branco\ 517nm} \right) \right] * 100 \quad (3)$$

Para o método de captura de Radicais Livres ABTS, foi avaliado o potencial antioxidante pelo processo de descoloração baseado na redução do radical monocatión [2,2' - azinobis- (3 - etilbenzotiazolina - 6 - ácido sulfúrico)] (ABTS*) na presença de doadores de hidrogênio antioxidantes, como descrito por Re et al. (1999). O radical ABTS (ABTS*) formado a partir da mistura de 3 mL de cada solução mãe previamente preparada, o ABTS (mmol/L) e o persulfato de potássio (concentração final 2,45 mmol/L) que foram deixadas reagindo por 16h em temperatura ambiente (25°C) na ausência de luz. Então formada, a solução foi diluída com água destilada (em torno de 4 mL do radical ABTS para 250 mL de água destilada) para obter uma absorvância de 0,70, a 735 nm.

Em microplaca, 20 μ L da amostra previamente diluída junto com 280 μ L de solução diluída do radical ABTS ($A_{734nm} = 0,700 \pm 0,020$) foi mantida na ausência de luz por 30 min,

para então fazer a leitura da absorbância por uma multi leitora (Infinite M200 TECAN, Zh switzerland) a 734 nm.

$$\text{Atividade antioxidante (\% inibição)} = \left[1 - \left(\frac{\text{Abs amostra}_{734\text{nm}}}{\text{Abs branco}_{734\text{nm}}} \right) \right] * 100 \quad (4)$$

2.2.8 Avaliação de compostos fenólicos (CFT)

A concentração de compostos fenólicos foi determinada com base na análise colorimétrica utilizando o reagente *Folin-Ciocalteu* (SINGLETON; ROSSI, 1965). Primeiramente, foi realizada uma diluição do extrato (1:3) e adicionado alíquotas de 15 μL junto à 240 μL de água destilada e 15 μL de *Folin-Ciocalteu* (0,2 N), em seguida, 30 μL de Na_2CO_3 20% foi adicionado. Os frascos foram mantidos em repouso, na ausência de luz, por 2 horas. Posteriormente realizada a leitura com absorbância de 765 nm. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de matéria seca (mg EAG.g⁻¹ tegumento de feijão seco), também foi necessário realizar a curva padrão com ácido gálico (AG) para comparar com leituras de absorbâncias dos extratos.

2.2.9 Identificação e quantificação das antocianinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrometria de massas

A análise foi realizada utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência LCMS-2020 (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com uma bomba binária, injetor automático, e detector de arranjo de díodo (SPD-M20A) acoplado a um espectrômetro de massas com fonte de ionização por *electrospray* e analisador de massas quadrupolo.

A separação das antocianinas foi utilizada uma coluna C18, com 25cm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e 5 μm de tamanho de partícula (NST, Santos, Brazil), com o forno de coluna a 40 ° C. A fase móvel foi composta de A (água acidificada com ácido fórmico a 0,1%) e B (metanol acidificado com ácido fórmico a 0,1%) no sistema de eluição de gradiente. A fase móvel foi de 14% B, com incremento linear de até 55% em 16min. De 16 a 27 minutos houve o incremento linear até 100% B para a limpeza da coluna e de 27 a 30 minutos ocorreu o decréscimo até 14% B, se mantendo assim pelos próximos 2 minutos. O fluxo de fase móvel foi de 1,2 mL.min⁻¹ e a injeção e o volume de injeção foram realizados com a identificação de 10 μL . A temperatura da interface do espectro de pulverização giratória era 350 °C, fluxo de gás

nebulizador de $1,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, bloco de calor de $200 \text{ }^\circ\text{C}$ e fluxo de gás de secagem de $15 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. A voltagem da interface era de $4,5 \text{ kV}$ e, a voltagem de raio-RF era de 60V . A identificação das antocianinas foi realizada pela confirmação de massas, no espectrômetro de massas.

2.2.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o software Statistica v. 13.5 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, EUA). Os resultados foram apresentados com média \pm desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) foi realizada para verificar se houve diferença significativa entre as amostras.

2.3 RESULTADO E DISCUSSÃO

2.3.1 Preparação e escolha dos DES para extração de antocianinas

Cinco diferentes soluções de DES, em diferentes concentrações, foram preparadas e testadas para extração de antocianinas dos tegumentos de feijões pretos comercialmente rejeitados, pelo processo convencional de extração, maceração (Figura 8). A adição de água ao sistema DES reduz a viscosidade desses solventes e permite uma melhor taxa de transferência de massa dos compostos alvos, melhorando a eficiência das extrações. Além disso, misturas de DES em água tem um menor custo de extração dos compostos ativos em comparação com o uso de 100% de DES. (BI; TIAN; ROW, 2013; GUO et al., 2019). Entretanto, a incorporação excessiva de água pode destruir os sistemas formado entre HBDs e HBAs, e enfraquecer a interação de DES com as antocianinas (KOU, et al. 2019; FU et al., 2021).

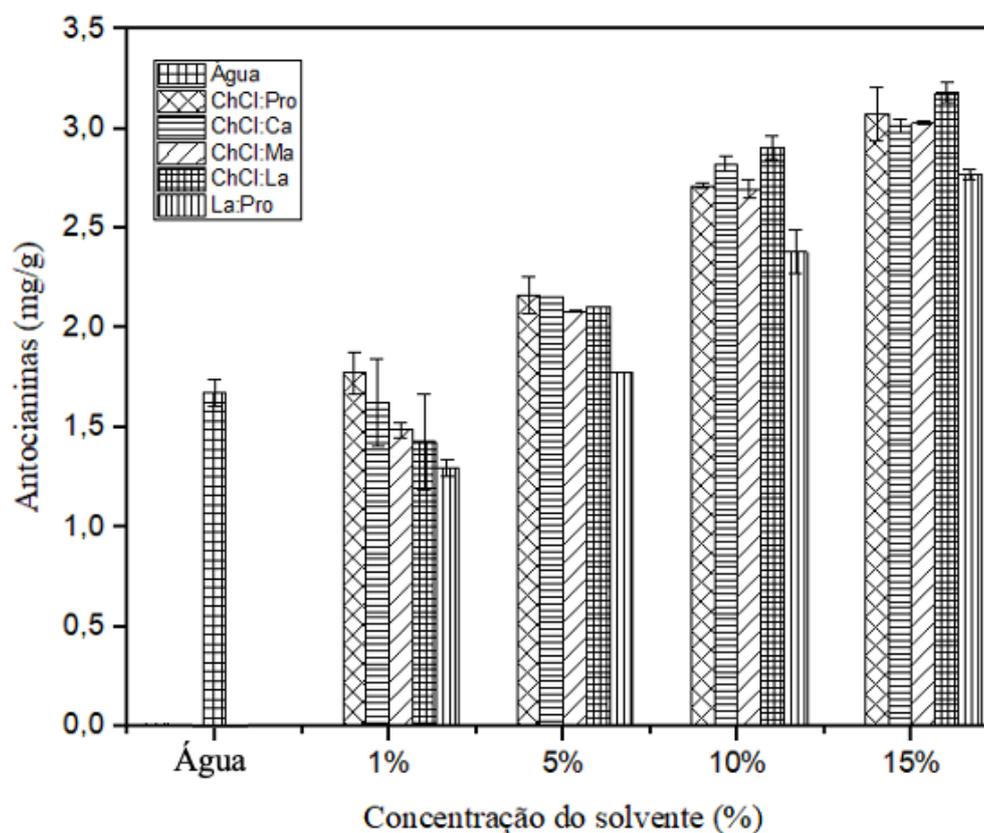
De acordo com os resultados da Figura 8 é possível observar que o aumento da concentração de DES na água elevou significativamente a extração das antocianinas, para todos os DES avaliados, se comparado com a extração com água pura, exceto quando foi empregada a concentração de 1% de DES, que, para a maioria dos solventes promoveu um rendimento em antocianina menor do que àquele obtido com água pura. Com 5% de DES foi possível observar um aumento significativo na extração das antocianinas totais, com exceção de 5% de DES La:Pro. Os maiores rendimentos de extração de antocianinas foram observados para as concentrações de 10 e 15% de DES em água. Comparando os resultados obtidos com 10% e com 15% de DES adicionado em água, para todos os DES estudados, não foi observada grande variação nas taxas de extração de antocianinas. Portanto, a sequência dos ensaios foram

conduzidos com concentrações próximas a 10% de DES em água, pois proporcionam menor custo de produção de solvente (SILVA et al., 2020).

De acordo com Fu et al. (2021), além da concentração, a composição dos DES também tem grande influência nas propriedades físico-químicas do solvente, determinando a eficiência de extração. Devido a isso, foi feita a seleção dos DES que melhores extraíram as antocianinas dos tegumentos de feijão preto. Os critérios empregados para a seleção dos DES foram o rendimento de extração de antocianinas e o preço de HBA e HBD. De acordo com o nosso estudo, os DES à base de cloreto de colina em combinação com ácidos orgânicos ofereceram maiores rendimentos em antocianinas, comparado com as extrações com água ou com água adicionada de outras combinações de HBA e HBD (La:Pro). O mesmo foi observado no trabalho de Bi et al, (2020) que fez uma triagem com alguns DES para extração de antocianinas da amora e mostrou que o rendimento da extração usando ácidos orgânicos como doadores de ligações de hidrogênio foram muito maiores do que aqueles de DES com outro tipo de mistura. Segundo Benvenuti et al., (2020), os solventes DES de base ácida proporcionam alto rendimento de extração de compostos bioativos devido à alta capacidade de dissolução do DES em baixos valores de pH. Este fenômeno apresenta uma alta capacidade de doar prótons e aceitar elétrons, solubilizando ambos compostos polares e apolares.

O cloreto de colina:ácido cítrico e cloreto de colina:ácido láctico foram considerado os melhores DES para a extração de antocianinas do tegumento de feijão preto. Kou et al., (2019) também observaram estes dois DES, os melhores solventes para a extração de antocianinas presentes na Groselha (*Ribes nigrum* L.). Dentre os DES estudados, o selecionado para as próximas etapas do trabalho foi o cloreto de colina:ácido cítrico, pois o ácido cítrico tem menor preço de mercado do que o ácido láctico, presente no DES ChCl:La, é eficiente na recuperação de antocianina, além do ácido cítrico ser de fácil manuseio e apresentar baixa toxicidade (SOCCOL et al., 2006).

Figura 8 - Extração de Antocianinas com diferentes DES em diferentes concentrações.

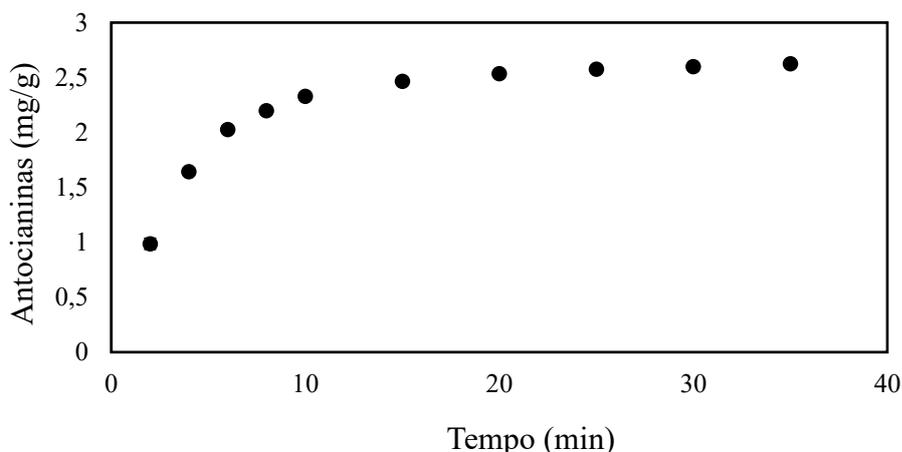


Fonte: a autora (2021).

2.3.2 Cinética da extração por SWE

A primeira etapa antes da otimização consistiu em uma triagem para o método SWE, afim de avaliar o menor tempo necessário para a extração de antocianinas presentes nos tegumentos. Esse tempo foi determinado e fixado para garantir que os métodos fossem adequados para determinação de compostos bioativo. Desta forma, para compreensão destes resultados, foi realizada a avaliação da cinética de extração. Os ensaios cinéticos foram conduzidos com temperatura de 110 °C, concentração de 5% e vazão 4 mL/min. Os resultados das curvas cinéticas, onde foi avaliado a concentração de antocianinas em base seca, são ilustrados nas Figura 9.

Figura 9 - Cinética da extração de antocianinas pelo método de SWE.



Fonte: a autora (2021).

O estudo cinético apresentou já nos primeiros minutos, uma elevada concentração de antocianinas. O tempo de equilíbrio de extração foi de aproximadamente 10 minutos, extraindo cerca de 2,3 mg/g de antocianinas. Este parâmetro é definido como o tempo necessário para que o sistema sólido-líquido entre em equilíbrio, e a concentração de antocianina presente no extrato permaneça constante. A partir desse tempo a extração não tem tanta influencia no rendimento do processo (RUDKE et al., 2019).

2.3.3 Otimização da extração em SWE

Embora a obtenção de extratos ricos em antocianinas encontrada em numerosas famílias de plantas tenha sido descrita em vários estudos (WANG et al., 2018, GARCÍA et al., 2006; JU; HOWARD 2003, PIÑEIRO; PALMA; BARROSO 2004; LOARCE et al., 2020), este é o primeiro trabalho que envolve SWE para recuperação de antocianinas dos tegumentos dos feijões pretos de baixo valor de mercado. Além disso, destaca-se a adição de DES na água subcrítica para ampliar a eficiência de extração. O método de SWE usa temperaturas acima de 90 °C e abaixo de 370 °C em pressão acima da atmosférica para mantê-lo em estado líquido. Essas condições do solvente diminuem a viscosidade e a tensão superficial do solvente, o que facilita a penetração na matriz sólida, aumentando a área de contato e a taxa de transferência de massa. A SWE tem como proposta ser um método para reduzir o tempo de extração, de energia e do uso de solventes, alcançando altos rendimento da extração (AZMIR, J., et al., 2013; HERRERO et al., 2013; MUFARI et al., 2020).

De acordo com a Tabela 4 para os ensaios de extração por SWE, os teores de antocianinas totais variaram significativamente ($p < 0,05$) de 0,5 a 3,5 mg/g. A maior

concentração foi obtida na condição do ensaio 14 ($T = 90\text{ }^{\circ}\text{C}$, vazão 5 mL/min e 5% de DES). Esse valor de 3,5 mg/g foi maior na menor temperatura utilizada no delineamento, visto que as AMT são sensíveis a temperatura (PETERSSON, et al., 2010). Ainda assim, esse valor é maior quando comparado com o processo de maceração que também utiliza 5% dos diferentes tipos de DES. Vale lembrar que o processo de SWE é muito mais rápido que o método convencional levando 10 minutos para a extração enquanto que a maceração levou 60 minutos. A menor quantidade recuperada foi atingida no ensaio 5 ($T = 130\text{ }^{\circ}\text{C}$, vazão de 4 mL/min e 9% de DES 9%), mostrando novamente a degradação pela temperatura.

O teor de compostos fenólicos (CFT) presente nos extratos variou de 27 a 43 mg EAG/g com os maiores valores obtidos para a maior concentração de DES (9%) e maior temperatura ($130\text{ }^{\circ}\text{C}$). Segundo Loarce et al, (2020), em trabalho avaliando os compostos presentes no subproduto de uva identificou que em temperaturas e concentrações de DES elevadas, há maior extração de compostos fenólicos extraídos por SWE. Com relação à atividade antioxidante *in vitro*, os valores dos extratos variaram significativamente ($p < 0,05$) de 206 a 419 $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$ para DPPH, e de 502 a 1099 $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$ para ABTS. Como pode ser observado para ambos os métodos antioxidantes os maiores (ensaio 7) e os menores (ensaio 1) valores foram com os mesmos ensaios, mostrando comportamento semelhante e que as condições de maior extração são iguais para as mesmas variáveis.

Tabela 4 - Resultados experimentais obtidos para o teor de antocianinas manoméricas totais (AMT), compostos fenólicos totais (CFT) e para atividade antioxidante *in vitro* por DPPH e ABTS.

Ensaio	SWE			AMT (mgC3G.g ⁻¹)	CFT (mgEAG.g ⁻¹)	DPPH (μ molET.g ⁻¹)	ABTS (μ molET.g ⁻¹)
	X1	X2	X3				
1	0	-1	1	1,9±0,1	31±1	206±1	502±13
2	1	1	0	1,1±0,1	40±4	378±3	890±32
3	0	-1	-1	2,8±0,1	26±1	251±1	635±1
4	-1	0	-1	2,7±0,1	26±1	287±6	825±10
5	1	0	1	0,5±0,1	43±1	317±4	839±9
6	0	0	0	2,0±0,1	27±4	282±8	711±7
7	0	1	-1	2,8±0,1	32±3	419±7	1099±3
8	-1	0	1	3,0±0,1	35±3	262±2	662±10
9	0	0	0	2,3±0,1	33±3	286±2	722±10
10	1	-1	0	0,9±0,1	29±2	247±5	626±3
11	0	0	0	2,1±0,1	25±2	291±1	729±3
12	1	0	-1	1,6±0,0	42±1	355±1	890±3
13	0	1	1	1,6±0,1	27±2	319±5	692±5
14	-1	1	0	3,5±0,1	34±1	354±3	890±12
15	-1	-1	0	2,6±0,1	28±1	218±0,3	567±1

Os valores naturais das variáveis independentes X1 (temperatura), X2 (vazão) e X3 (proporção de solventes).
Fonte: a autora (2021).

Associado aos dados obtidos do planejamento experimental (Tabela 4), modelos matemáticos foram construídos a fim de descrever o processo das variáveis respostas em funções dos coeficientes independentes (Tabela 5). Além disso, as superfícies de resposta 3D (MSR) foram plotadas, com os modelos de regressão múltipla construídos para melhor identificar os efeitos das variáveis independentes em função das respostas estudadas (Figura 10). Estas ferramentas são muito utilizadas para a otimização, visto que é capaz de avaliar vários parâmetros (NAZGHELICHI; AGHBASHLO; KIANMEHR, 2011 AGU et al., 2020).

O modelo proposto para a extração de AMT por SWE não apresentou falta de ajuste ($p = 0,177$). Além de conseguir explicar mais de 80 % da variância dos dados experimentais com R^2 ajustado de 0,830. Os efeitos que foram significativos para AMT, foram os efeitos lineares

negativos de temperatura (X_1) e concentração do solvente DES (cloreto de colina:ácido cítrico) em água (X_2). Esses valores indicam que se ocorrer uma redução dessas duas variáveis, temperatura e concentração, a quantidade de AMT aumenta. Esses fatores também podem ser observados na superfície de resposta que mostra que, elevadas temperaturas e concentrações a quantidade de AMT é reduzida (Figura 10).

Segundo Petersson et al., (2010) a temperatura pode ter degradado as AMT, um problema comum no uso de SWE para extração de compostos termolábeis. E como as antocianinas são fortemente influenciadas pela temperatura, a elevação da temperatura acelerou o processo de degradação (PATRAS et al., 2010; DAI et al., 2014), causando o efeito negativo desta variável. E mesmo o DES à base de ácido, apresentando fortes evidências na capacidade de extração de AMT por maceração, para esse processo (SWE) menores concentrações mostraram ser mais eficiente para a extração. Para CFT o modelo foi significativo ($p < 0,05$) e não teve falta de ajuste ($p = 0,523$). Entretanto o seu coeficiente de determinação foi baixo $R^2 = 0,523$. Por isto, para a otimização multiresposta o modelo CFT foi desconsiderado.

Para DPPH e ABTS, os modelos foram significativos ($p < 0,05$) para ambos os métodos, não apresentando falta de ajuste, podendo explicar mais de 90 % da variância total com um R^2 ajustado = 0,92 para DPPH e R^2 ajustado = 0,98 para ABTS. Nos modelos obtidos, todos os efeitos lineares foram significativos. A temperatura (X_1) e vazão (X_2) aumentaram significativamente os valores da atividade antioxidante para ambos os métodos, enquanto que a concentração de DES (cloreto de colina:ácido cítrico) adicionados na água (X_3) foi responsável por reduzir (quanto menor a concentração maior a extração). Esse aumento de temperatura faz com que as ligações soluto-matriz se rompam, aumentando a solubilidade e difusividade, e conseqüentemente, diminuindo a viscosidade. Essas condições levam um aumento significativo de antioxidantes (MJALLI; MOUSA, 2017).

O aumento da vazão de solvente influenciou positivamente a extração dos antioxidantes, isso é explicado pelo sistema de extração ser contínuo, fazendo com que diminua a resistência de transferência de massa externa. E por ser contínuo o maior fluxo de solvente juntamente com o material vegetal deslocam o equilíbrio para frente, extraindo assim mais compostos (ESSIEN; YOUNG; BAROUTIAN, 2020)

Além desses efeitos para o modelo ABTS outras interações foram significativas, tais como o efeito quadrático da temperatura (X_{11}) e da vazão (X_{22}) inferindo uma atividade antioxidante positiva em todo o fluxo. A interação positiva entre a temperatura quadrática e a vazão ($X_{11} X_2$) também obteve maior quantidade. As interações da vazão com a concentração

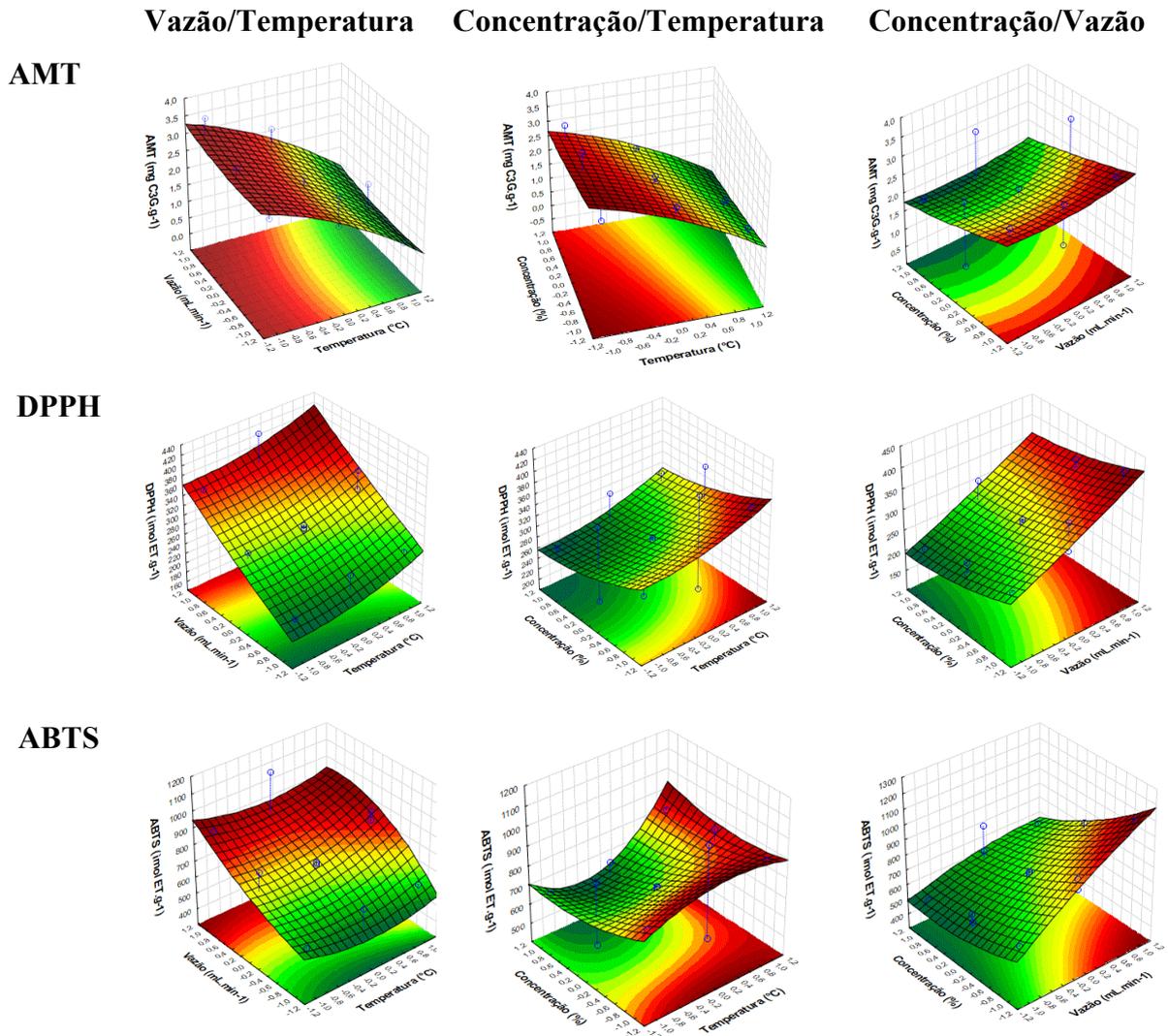
de DES (X_{23}) e temperatura com concentração quadrática ($X_1 X_{33}$) inferiu negativamente na extração.

Tabela 5 - Valores paramétricos da equação polinomial de segunda ordem, para cada método de extração e informações estatísticas do procedimento de ajuste do modelo.

Efeito		Extração por água subcrítica (SWE)			
		AMT	CFT	DPPH	ABTS
Intercepto	X_0	2,117	28,256	286,578	720,708
Efeito linear	X_1	-0,987	3,874	21,890	60,332
	X_2	ns	ns	68,564	146,949
	X_3	-0,357	ns	-25,890	-134,975
Efeito quadrático	X_{11}	ns	6,105	ns	47,367
	X_{22}	ns	ns	ns	35,948
	X_{33}	ns	ns	ns	ns
Efeito interativo	X_{12}	ns	ns	ns	ns
	X_{13}	ns	ns	ns	ns
	X_{23}	ns	ns	ns	-68,556
	$X_{11} X_2$	ns	ns	ns	81,619
	$X_{11} X_3$	ns	ns	ns	ns
	$X_1 X_{33}$	ns	ns	ns	-45,763
Análise Estatística	FL	0,177	0,523	0,068	0,083
	R^2	0,854	0,501	0,941	0,997
	R^2_{adj}	0,830	0,418	0,925	0,985

AMT: antocianinas monoméricas totais; CFT: compostos fenólicos totais; DPPH: potencial antioxidante por DPPH; potencial antioxidante por ABTS; ns: não significativo; FL: falta de ajuste; R^2 : coeficiente de determinação; R^2_{adj} : coeficiente de determinação ajustado. Fonte: a autora (2021).

Figura 10 - Superfície de resposta para antocianinas monoméricas totais (AMT), compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante (DPPH e ABTS), obtidos pelo método SWE.



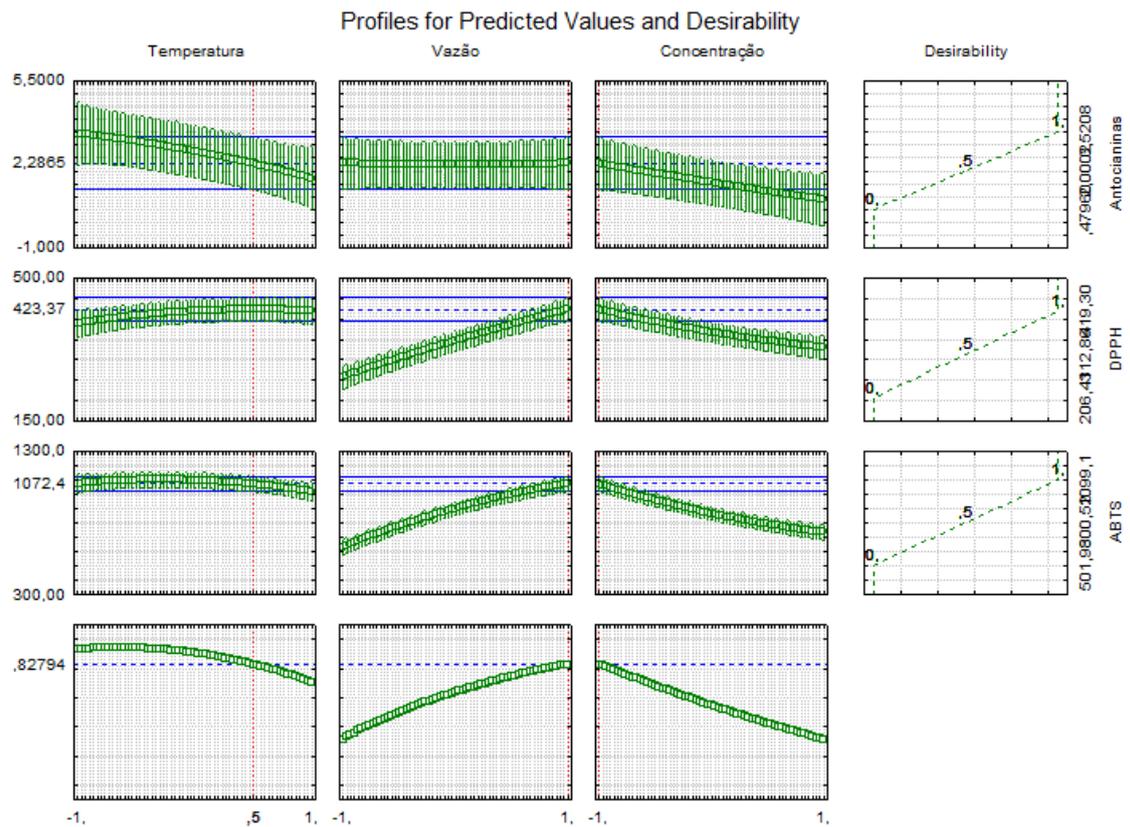
Fonte: a autora (2021).

2.3.4 Condições ideais de extração por SWE

Com os modelos construídos para as respostas AMT, DPPH e ABTS, foi realizada uma otimização multiresposta usando a função desejabilidade (Figura 11). Através da otimização o ponto ótimo de extração foram temperatura (120 °C), vazão (5 mL/min) e concentração de DES em água (1%), com mais de 80% do objetivo proposto alcançado tendo um valor de desejabilidade de 0,82794. Então, uma validação externa foi realizada repetindo o ponto ótimo proposto (Tabela 6). Os dados experimentais confirmam que os modelos matemáticos são

adequados para descrever o método de extração, em um intervalo de confiança 95 % para todas as variáveis.

Figura 11 - Gráfico da desejabilidade obtido para as variáveis respostas AMT, DPPH e ABTS em função das variáveis independentes temperatura, concentração de solvente e vazão.



Fonte: a autora (2021).

Tabela 6 - Valores preditos e experimentais das variáveis, no ponto ótimo da extração.

Variável Resposta	Valores			
	Predito*	- 95% confiança	+ 95% confiança	Experimental**
AMT (mg C3G.g⁻¹)	2,55	2,54	4,31	2,55
DPPH (µmol ET.g⁻¹)	409,12	130,24	430,64	377,09
ABTS (µmol ET.g⁻¹)	949,01	520,10	838,82	521,22

AMT: Antocianinas monoméricas totais; CFT: compostos fenólicos totais; *Valores preditos para o modelo; **Valores experimentais observados. Fonte: a autora (2021).

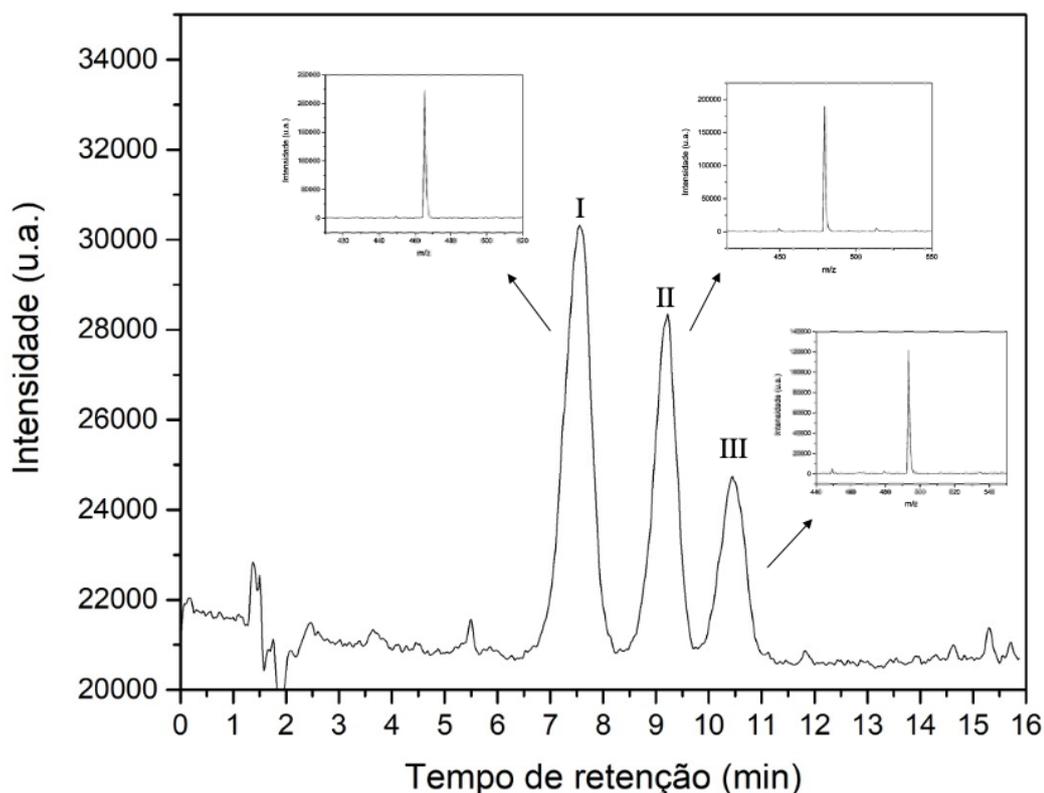
A extração em água subcrítica (SWE) foi realizada com o uso de solventes emergentes conhecidos como solventes eutéticos profundo (DES), para aumentar a recuperação de antocianinas de subprodutos do feijão, comparado com o método de maceração. A SWE é um método ambientalmente amigável, realizado de maneira rápida (HERRERO et al., 2013; MUFARI et al, 2020). Nesse trabalho, identificou-se valores de AMT satisfatórios quando comparados com o método convencional por maceração. O ponto ótimo de extração por SWE (cloreto de colina:ácido cítrico a 1 %, temperatura de extração de 120 °C e vazão de 5mL/min) permitiu a recuperação de 50% a mais de AMT em relação o método por maceração com a mesma concentração de DES (cloreto de colina:ácido cítrico) 1%. E mesmo a temperatura apresentando degradação das antocianinas na superfície de resposta, o método mostrou ser adequado na extração com concentração reduzida de solvente.

2.3.5 Quantificação das antocianinas presentes nos extratos por HPLC

Depois da otimização por SWE, os extratos ricos em antocianinas (obtidos no ponto ótimo da extração) tiveram as antocianinas individuais identificadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (Figura 12). As três principais antocianinas identificadas por seus respectivos íons foram: delphinidina-3-O-glicosídeo [M +] 465,1 petunidina-3-O-glicosídeo [M +] 479,12 e malvidina-3-O-glicosídeo [M +] 493,13 (Figura 10). De acordo com

os trabalhos realizados por Takeoka et al., (1997), Wu; Prior (2005), e Mojica et al., (2015) estas são as principais antocianinas encontradas no feijão preto.

Figura 12 - Cromatograma de HPLC representativo do extrato de antocianina. Os espectros de massas correspondentes a cada composto são mostrados em cima de cada pico. Picos: (I) delphinidina-3-O-glicosídeo; (II) petunidina-3-O-glicosídeo; e (III) malvidina-3-O-glicosídeo.



Fonte: a autora (2021).

O teor total de antocianinas individuais foi de 3,7 mg/g, delphinidina-3-O-glicosídeo o representou a maior proporção de 39,3% do total, seguido de petunidina-3-O-glicosídeo com 38,7% e de malvidin-3-O-glicosídeo com 21,9% do total (Tabela 7). A composição e a quantidade das antocianinas individuais do extrato avaliado no trabalho foram de acordo com os estudos reportado por Mojica et al., (2017). Essas antocianinas apresentam propriedades biológicas como antioxidante, antimutagênese, antifibrótica, anti-inflamatória, antiangiogênica, efeito neuroprotetor e inibição enzimática (PATEL; JAIN; PATEL, 2013; FENG et al., 2010; KUMORO; RETNOWATI; BUDIYATI, 2010).

Tabela 7 - Concentrações de antocianinas monoméricas individuais determinadas por HPLC dos extratos SWE.

Antocianinas	Concentração em mg/g de peso seco	Íon (m/z)	t_R (min)	Formula química
Delfinidina-3-O-glicosídeo	1,45	464,1[M] ⁺	7,5	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂
Petunidina-3-O-glicosídeo	1,43	479,1[M] ⁺	9,1	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₂
Malvidina-3-O-glicosídeo	0,81	493,1[M] ⁺	10,4	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂
Total	3,69			

Fonte: a autora (2021).

2.4 CONCLUSÃO

O solvente eutético profundo (DES) à base de cloreto de colina:ácido cítrico se apresentou como um solvente alternativo promissor para a extração de antocianinas monoméricas totais (AMT) encontradas nos tegumentos de feijão. A extração usando a adição de 10% DES (cloreto de colina:ácido cítrico) em água aumentou 40% o teor de antocianinas totais em relação à água como solvente. Baseado nisto, o método utilizando água subcrítica foi empregado para favorecer a extração. A partir dos modelos matemáticos propostos e usando uma otimização multi-resposta os pontos ótimos para maximizar a extração de AMT, DPPH e ABTS foram cloreto de colina:ácido cítrico a 1 % e temperatura de extração de 120 °C e vazão de 5mL/min, obtendo 50% a mais de AMT quando comparado com o método por maceração na mesma concentração de DES 1%. Os resultados desse estudo forneceram fundamentação teórica e base científica para avaliação de outros métodos de extração, com temperaturas não tão elevadas utilizando DES para recuperação de antocianinas presentes no tegumento de feijão rejeitados.

CAPÍTULO 3

**ESTABILIDADE E CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS RICO EM ANTOCIANINAS
EMPREGANDO TECNOLOGIAS EMERGENTES**

3.1 INTRODUÇÃO

As antocianinas são responsáveis por uma variedade de cores como, rosa, vermelho, violeta e azul. Por apresentarem estas colorações atraentes, elas podem ser usadas como corante natural na indústria de alimentos e farmacêutica. Além disso, podem apresentar potencial biológico, retardando assim o progresso de várias doenças devido a sua propriedade antioxidante (LIMA et al., 2007; ZHU, 2018; BRAGA et al., 2019). A extração de compostos bioativos como as antocianinas, depende do método de extração e das condições de processo aplicadas, para evitar a degradação dos componentes recuperados (FALLAH et al., 2020; TEIXEIRA et al., 2021).

A extração assistida por ultrassom (UAE) tem sido relatada como uma técnica alternativa verde e economicamente viável, comparada às técnicas convencionais devido a alta extração de compostos bioativos (CHEMAT et al., 2017). A UAE apresenta várias vantagens como: transferência mais rápida de massa diminuindo assim o tempo de extração, emprego de baixas temperaturas, altos rendimentos de processo, método simples, baixo consumo de solventes, baixo consumo energético e facilidade durante a operação (CHEMAT et al., 2017; PERERA; ALZHRANI, 2021).

Juntamente com o interesse em alternativas verdes de extração, como a UAE, temos a utilização de solventes alternativos conhecidos como solvente eutéticos profundos (DES). Esses solventes alternativos surgiram no âmbito da química verde, que prioriza a saúde humana e a natureza. Atualmente, os DES começaram a receber atenção notável como candidatos a solventes verdes e uma alternativa potencial para os solventes orgânicos tradicionais (TÜRKER e DOĞAN, 2020). Segundo Dai et al., (2014) os DES além de aumentar a eficiência de extração, podem melhorar a estabilidade dos compostos extraídos quando estes são submetidos às condições como alta temperatura e longo tempo de armazenamento, se comparado aos extratos recuperados com água e etanol.

Uma operação unitária importante após a extração é a concentração de extratos ricos em compostos bioativos. Após concentrados, os produtos ocupam menos espaço, peso, o qual podem proporcionar uma melhor logística de distribuição e facilitar o seu uso industrial. Essa operação pode ser feita através de diferentes mecanismos, entre eles o uso de altas temperaturas (evaporação), concentração por congelamento (crioconcentração) ou através da separação por membrana (PETZOLD, et al., 2016).

As antocianinas são compostos altamente instáveis em temperaturas elevadas, pois o aquecimento provoca a hidrólise da ligação glicosídica com formação da chalcona. Existem

evidências de que a hidrólise glicosídica das antocianinas seja a principal causa da sua perda de cor. Por isso o emprego de métodos alternativos que não utilizem altas temperaturas, tanto no processo de extração como para a concentração ou aplicação dos extratos contendo antocianinas é tão relevante (MALACRIDA et al., 2006).

A crioconcentração é uma opção viável para concentrar extratos ricos em antocianinas, visto que este processo ocorre em baixas temperaturas. O método é usado para recuperar o soluto de uma solução com base na separação de cristais de gelo puros de uma fase aquosa concentrada por congelamento (PETZOLD et al., 2016). Além disso, é importante destacar que os DES empregados como solventes em misturas aquosas, apresentam baixa pressão de vapor, o que dificulta a concentração dos extratos mediante o emprego de técnicas a elevadas temperaturas (NIKNADDAF et al., 2020; HANSEN et al., 2020).

Desta forma, os objetivos deste estudo foram: i) otimizar a extração assistida por ultrassom das antocianinas provenientes do tegumento de feijão preto comercialmente rejeitados, usando como solvente água enriquecida com solventes eutéticos profundos (DES), ii) verificar a estabilidade dos extratos rico em antocianinas em DES e iii) crioconcentrar os extratos usando o método de crioconcentração em blocos assistido por centrifugação.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Preparação de material vegetal

A preparação da matéria-prima vegetal seguiu a mesma metodologia descrita no capítulo anterior (seção 2.2.1).

3.2.2 Projeto de triagem para UAE

Para o método de UAE também foi realizado uma cinética para determinar o tempo de extração, como na seção 2.2.4. Utilizado os pontos centrais das variáveis independentes do planejamento fatorial completo (potência 300 W, temperatura 50 °C e concentração de DES em água 5%). As variáveis para essa técnica foram definidas a partir de dados da literatura (BOSILJKOV et al., 2017; CHEN et al., 2007; HELENO et al., 2016; PINELA et al., 2019).

3.2.3 Otimização de extração por UAE

Os extratos do tegumento de feijão foram obtidos empregando-se a técnica de extração assistida por ultrassom (UAE), com o uso do solvente DES (cloreto de colina:ácido cítrico). As extrações foram realizadas em 15 experimentos aleatórios de acordo com a combinação de variáveis geradas pelo delineamento experimental Box-Behnken (BOX; BEHNKEN, 1960). Para os ensaios de UAE foi utilizado cerca de 0,5 g de tegumento do feijão preto seco e moído (20 a 32 *mesh*), submetido a UAE por 10 min (tempo definido por testes preliminares, seção 3.2.2).

A Tabela 8 representa as combinações dos fatores distribuídos segundo o planejamento fatorial, onde três variáveis de processo foram avaliadas, temperatura, variando de 30 a 70 °C (X1), potência variando de 150 a 450 W (X2) e concentração de DES (cloreto de colina:ácido cítrico) variando de 1 a 9% (X3) em três níveis. Os extratos obtidos por UAE foram centrifugados a 4515 x g (Quimis, Q222T, Diadema, Brasil) por 10 min, e armazenados em frascos âmbar até análises posteriores de antocianinas monoméricas totais (seção 2.2.6), teores de fenólicos totais (seção 2.2.8), atividade antioxidante *in vitro* medida por ABTS por DPPH (seção 2.2.7). A otimização foi realizada de acordo com o capítulo anterior, demonstrado na seção 2.2.4.

Tabela 8 - Planejamento fatorial Box-Benhken, para encontrar melhores parâmetros experimentais.

Ensaio	Variáveis codificadas e valores reais		
	X1 Temperatura (°C)	X2 Potência (W)	X3 Concentração (%)
1	0(50)	-1(150)	+1(9)
2	+1(70)	+1(450)	0(5)
3	0(50)	-1(150)	-1(1)
4	-1(30)	0(300)	-1(1)
5	+1(70)	0(300)	+1(9)
6	0(50)	0(300)	0(5)
7	0(50)	+1(450)	-1(1)
8	-1(30)	0(300)	+1(9)
9	0(50)	0(300)	0(5)
10	+1(70)	-1(150)	0(5)
11	0(50)	0(300)	0(5)
12	+1(70)	0(300)	-1(1)
13	0(50)	+1(450)	+1(9)
14	-1(30)	+1(450)	0(5)
15	-1(30)	-1(150)	0(5)

Fonte: a autora (2021).

3.2.4 Estabilidade dos extratos ricos em antocianinas

Para a realização da avaliação da estabilidade das antocianinas, com relação os efeitos do aquecimento, foram utilizados os métodos descritos por Mercali, et al., (2013) e Peron et al., (2017) com algumas modificações.

- Avaliação do efeito da temperatura

Os extratos ricos em antocianinas, obtidos por UAE, na condição do ponto ótimo de extração, conforme apresentado na seção 3.3.2, e um extrato controle (obtido na mesma

extração, porém usando água como solvente), foram colocadas em frascos de vidro com tampas de rosca e colocadas em banho-maria pré-aquecido com temperatura controlada de 90, 80, 70 e 60 °C. Três tubos de cada temperatura foram removidos do banho maria após 15, 30, 60, 120, 180, 240 e 300 min e rapidamente resfriados à temperatura ambiente, e então realizada as análises de antocianinas monoméricas totais (seção 2.2.6).

Os dados da mudança no conteúdo de antocianina ao longo do tempo em diferentes temperaturas foram ajustados a um modelo de cinética de degradação. A constante da taxa de degradação das antocianinas (k) para cada temperatura, foi definida por uma regressão dos dados experimentais da concentração inicial com o aumento do tempo, conforme descrito pela equação 5.

$$C_A = C_{A0} \cdot e^{-\kappa_d \cdot t} \quad (5)$$

Onde, C_A é a concentração de antocianinas em um determinado tempo, em $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; C_{A0} é a concentração inicial de antocianinas em $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; t é o tempo em s e κ_d é a constante cinética de degradação em min^{-1} .

A partir dos dados da constante cinética de degradação foi encontrado o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), tempo de redução decimal (valor D) e coeficiente de temperatura (Q10). As equações usadas para o calculo destes parâmetros são representadas a seguir.

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln(0,5)}{\kappa_d} \quad (6)$$

Onde, $t_{\frac{1}{2}}$ é o tempo de meia-vida.

Na cinética de degradação térmica, faz-se necessário o conhecimento de parâmetros, como o valor D, também conhecido como tempo de redução decimal. Ele nos mostra o tempo necessário para que ocorra uma redução de 10 vezes na concentração inicial do extrato a uma determinada temperatura, de acordo com a equação 7:

$$D = \frac{\ln(10)}{\kappa_d} \quad (7)$$

Onde, D é o tempo de redução decimal.

O coeficiente de temperatura (Q10), por sua vez, denota o quanto mais rápido uma reação ocorre quando a temperatura é elevada 10 °C, de acordo com a equação 8.

$$Q_{10} = \left(\frac{\kappa_{dT_2}}{\kappa_{dT_1}} \right)^{\frac{10}{T_2 - T_1}} \quad (8)$$

Onde, κ_{dT_1} é a constante cinética de degradação em relação à temperatura T1; κ_{dT_2} é a constante cinética de degradação em relação à temperatura T2; T1 é a temperatura e T2 é a temperatura.

Termodinâmica do processo degradativo

A energia de ativação (E_a) foi determinada a partir da equação de Arrhenius, representada pela equação 9:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R.T} \quad (9)$$

Onde, A é o fator de frequência em s^{-1} ; E_a é a energia de ativação da reação de degradação em $kJ.mol^{-1}$, T é a temperatura em K e R é a constante dos gases em $J.mol^{-1}.K^{-1}$.

A entalpia de ativação foi definida pela equação 10:

$$\Delta H = E_a - R.T \quad (10)$$

Onde, ΔH é a variação da entalpia em $kJ.mol^{-1}$; E_a é a energia de ativação da reação de degradação em $kJ.mol^{-1}$; R é a constante dos gases ideais em $kJ.mol^{-1}.K^{-1}$ e T é a temperatura em K.

A energia livre de Gibbs (ΔG), pode ser determinada como expresso na equação 11:

$$\Delta G = -R.T \ln \left(\frac{\kappa_{d.h}}{\kappa_{B.T}} \right) \quad (11)$$

Onde, ΔG é a variação da energia livre de Gibbs em $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$; R é a constante dos gases ideais em $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$; T é a temperatura em K ; k_d é a constante de degradação térmica em s^{-1} ; h é constante de Planck, com valor igual a $6,6262 \times 10^{-34} \text{J}\cdot\text{s}$; k_B é constante de Boltzmann, com valor igual a $1,3806 \times 10^{-23} \text{J}\cdot\text{K}^{-1}$.

A entropia de ativação (ΔS) é definida pela equação 12:

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (12)$$

Onde, ΔS é a variação da entropia em $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$;

3.2.5 Avaliação do efeito da luz na degradação da antocianina

O efeito da luz foi determinado em temperatura ambiente ($20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) seguindo os métodos descrito por Dai et al., 2014 e Pedro et al., 2016. Tubos de ensaio contendo os extratos (obtidos no ponto ótimo de UAE com 8,2% do solvente DES cloreto de colina:ácido cítrico) foram expostos à luz direta de uma lâmpada fluorescente branca (20 W) em uma câmara fechada de madeira (435 x 435 mm) por 5 dias. Um ensaio controle (extrato obtido apenas com água) também foi submetido as mesmas condições e por igual período de tempo. A retenção do pigmento em cada tubo foi expressa como porcentagem de antocianinas pelo método diferencial de pH (seção 2.2.6), registrado nos tempos de 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas. A taxa constante para degradação de antocianinas (k) e seu tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foram calculadas conforme descrito pelas Equações 5 e 6.

3.2.6 Crioconcentração em blocos assistida por centrifugação

A crioconcentração dos extratos foi baseada na metodologia proposta por Petzold et al., (2016), com algumas modificações. A Figura 13 mostra o aparato experimental no qual a superfície externa dos tubos de centrifugas foram recobertos com isolamento térmico feito de poliestireno, para que a transferência de calor durante o congelamento ocorresse principalmente em uma única direção.

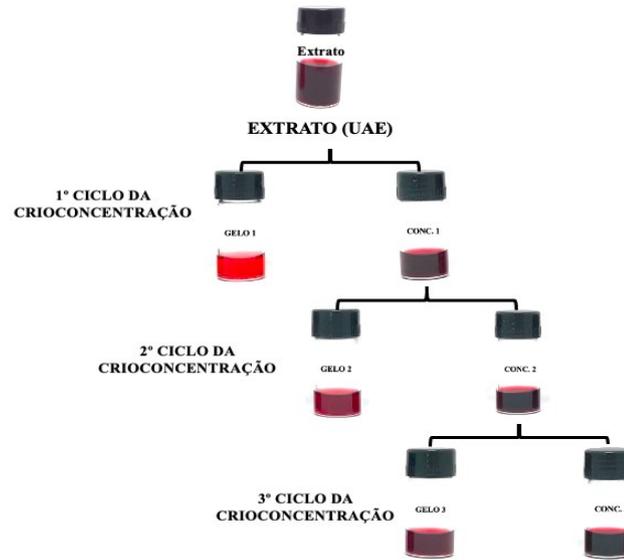
Figura 13 - Condição de congelamento dos extratos de antocianinas dos tegumentos de feijão preto.



Fonte: a autora (2021).

Em tubos de centrifugas tipo Falcon (volume = 50 mL; diâmetro interno $D = 15$ mm), 15 mL dos extratos ricos em antocianinas (obtidos no ponto ótimo da extração seção 3.3.2) foram congelados em freezer estático a -20 ± 2 °C por 12 h. As amostras congeladas foram removidas do congelador e rapidamente transferidas para uma centrífuga (centrífuga Quimis, modelo Q222T, Aparelho Científico LTDA, Brasil) operada por 15 min a $4515 \times g$ para forçar a separação de solutos das amostras congeladas, obtendo duas frações: concentrado e gelo. Estas frações, concentrado de antocianinas e gelo descongelado foram determinadas pelas seções 2.2.6 e 2.2.9. Após a análise das frações, o concentrado de antocianinas foi novamente dividido em tubos Falcon com 15 mL e congelada a -20 ± 2 °C por 12 h e o mesmo processo foi repetido para os próximos ciclos. Este procedimento se repetiu por 3 etapas, tendo como finalidade preservar a qualidade das antocianinas (Figura 14). O processo e as medições foram realizados em triplicata.

Figura 14 - Procedimento experimental geral



Fonte: a autora (2021).

Para cada etapa da concentração foram realizados cálculos de porcentagem de concentrado, eficiência de concentração e validação de resultados, de acordo com as equações a seguir.

Porcentagem da concentração de extrato

O percentual de concentração do extrato foi avaliado em cada ciclo de crioconcentração, representando a evolução no tempo com remoção de cada fase congelada. E esses valores foram calculados com os pesos inicial e final da fração congelada usando a seguinte equação:

$$Pc(\%) = \frac{W_i^0 - W_i^f}{W_i^0} \cdot 100 \quad (13)$$

Onde W_i^0 e W_i^f são os pesos inicial e final da fração congelada, respectivamente.

Eficiência de concentração

A eficiência de cada ciclo de crioconcentração foi definida com o aumento da concentração de antocianinas manoméricas totais. A seguinte equação foi usada para calcular a eficiência:

$$n(\%) = \frac{C_c - C_i}{C_c} \cdot 100 \quad (14)$$

Onde C_c e C_i são as concentrações de antocianinas manoméricas totais na solução concentrada e na fração congelada, respectivamente.

Validação de resultados

Para realizar essa validação dos resultados experimentais obtidos, foi feito um balanço de massa de cada ciclo de crioconcentração. Esses valores foram obtidos utilizando as equações a seguir:

$$W_e = \frac{m_{\text{gelo}}}{m_{\text{inicial}}} \quad (15)$$

$$W_p = \frac{C_c - C_0}{C_c - C_f} \quad (16)$$

onde C_0 é a concentração inicial de sólidos; C_f é a concentração final de sólidos; W_e valor experimental e W_p é o valor previsto.

A qualidade do ajuste entre os valores experimentais (W_e) e previsto (W_p) para N pontos experimentais de cada ciclo de crioconcentração foi testada pela raiz quadrada média (RMS) da seguinte forma:

$$RMS(\%) = 100 \sqrt{\frac{\sum [(W_e - W_p) / W_e]^2}{N}} \quad (17)$$

3.2.7 Identificação e quantificação das antocianinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A análise cromatográfica dos extratos UAE do tegumento de feijão preto e os extratos crioconcentrados foram realizados como da seção 2.2.9.

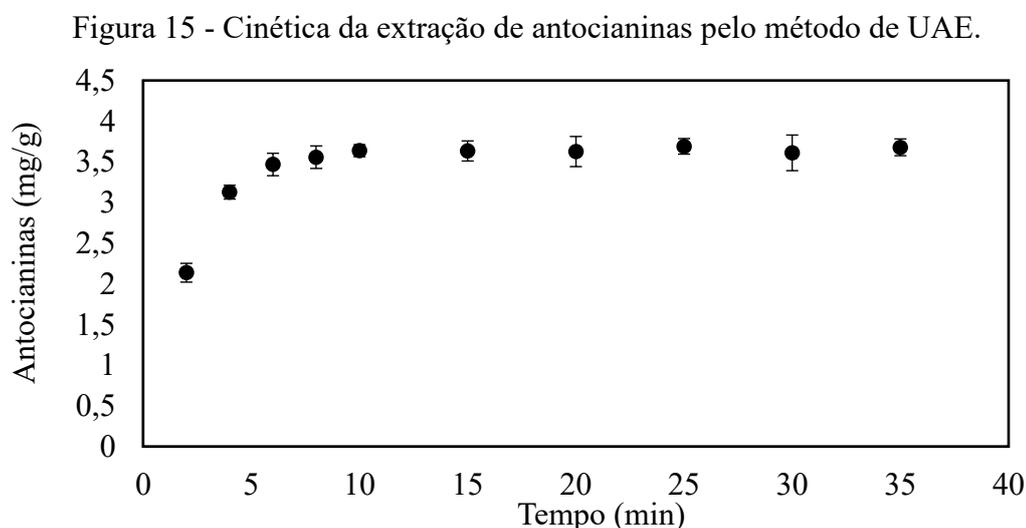
3.2.8 Análise estatística

A análise estatística para o processo por UAE foi realizada seguindo a secção 2.2.10.

3.3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.3.1 Cinética da extração por UAE

A primeira etapa antes da otimização consistiu em uma triagem para o método UAE, afim de avaliar o menor tempo necessário para a extração de antocianinas presentes nos tegumentos de feijão. Esse tempo foi determinado e fixado para garantir que os métodos fossem adequados para determinação de compostos bioativos. Desta forma, para compreensão destes resultados, foi realizada a avaliação da cinética de extração. Os ensaios cinéticos foram conduzidos com temperatura de 50 °C, concentração de 5% e potência 300 W. Os resultados das curvas cinéticas, onde avaliou-se a concentração de antocianinas em base seca, são ilustrados nas Figura 15.



Fonte: a autora (2021).

O estudo cinético apresentou já nos primeiros minutos, uma elevada concentração de antocianinas. O tempo de equilíbrio de extração foi de aproximadamente 10 minutos, extraindo cerca de 3,6 mg/g de antocianinas. Este parâmetro é definido como o tempo necessário para que o sistema sólido-líquido entre em equilíbrio, e a concentração de antocianina presente no extrato permaneça constante.

3.3.2 Otimização da extração assistida por ultrassom (UAE)

A Tabela 9 apresenta os resultados experimentais obtidos com as extrações seguindo as condições de processo combinada através do planejamento Box-Behnken. Os resultados são expressos em termos de teor de antocianinas monoméricas totais (AMT), teor de compostos fenólicos totais (CFT) e potencial antioxidantes dos extratos por técnicas *in vitro* (DPPH e ABTS). Os teores de antocianinas totais variaram significativamente ($p < 0,05$) de 1,6 a 4,1mg/g. A maior concentração foi obtida na condição do ensaio 2 ($T = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$, potência 450 W e concentração de solvente de 5% de DES em água); e a menor foi atingida pelo ensaio 4, realizado em $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, com potência 300 W e a menor proporção de DES 1%. Os teores de compostos fenólicos variaram de 37 a 112 mg EAG/g. Os níveis mais altos de compostos fenólicos (CFT), foram com maior concentração de DES (9%), sendo 112,198 mg EAG/g para um $p < 0,05$. A atividade antioxidante *in vitro* dos extratos medido por DPPH apresentou concentrações que variaram significativamente ($p < 0,05$) de 248 (ensaio 15) a $434\text{ }\mu\text{mol ET.g}^{-1}$ (ensaio 5). Já o método de ABTS, as concentrações variaram significativamente ($p < 0,05$) de 373 (ensaio 12) a $966\text{ }\mu\text{mol ET.g}^{-1}$ (ensaio 4).

A partir dos dados experimentais, a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) foi aplicada com o objetivo de gerar um modelo matemático capaz de descrever o processo estudado (AGU et al., 2020; ONOJI, et al., 2019; YUAN, et al., 2019). Em seu estudo, Huang et al., (2019) utilizou a metodologia de superfície de resposta acoplada à análise de regressão múltipla com a finalidade de encontrar as melhores condições de ultrassom para realizar uma extração adequada. Um planejamento Box-Behnken (BBD), com 3 níveis e 4 fatores, foi aplicado para obter as melhores condições de extração de antocianinas e compostos fenólicos presentes na batata doce roxa. O extrato obtido em condição otimizada ($64\text{ }^{\circ}\text{C}$, 80 min e 42 mL/g) apresentou menor viscosidade, o que favoreceu a maior recuperação de antocianinas. Um total de dez antocianinas foram identificados. Em outro estudo com objetivo semelhante de extração, Hammi et al. (2015), realizaram a otimização da extração de compostos fenólicos da fruta *Ziziphus jujuba* por meio da tecnologia de UAE usando o delineamento composto central rotacional (DCCR) com quatro variáveis independentes. Os resultados também mostraram que as frutas *Ziziphus jujuba* apresentam atividades antioxidantes potenciais, tornando benéficas para a saúde humana.

Tabela 9 - Resultados experimentais obtidos para os teores de antocianinas monoméricas totais (AMT), compostos fenólicos (CFT) e potencial antioxidante dos extratos, por técnicas *in vitro* (DPPH e ABTS).

Ensaio	UAE						
	X1	X2	X3	AMT (mgC3G.g ⁻¹)	CFT (mgEAG.g ⁻¹)	DPPH (μmolET.g ⁻¹)	ABTS (μmolET.g ⁻¹)
1	0	-1	1	3,7±0,2	73±4	389±2	707±4
2	1	1	0	4,1±0,4	105±1	417±9	966±7
3	0	-1	-1	2,8±0,1	47±3	276±6	543±6
4	-1	0	-1	1,6±0,1	37±7	253±11	373±3
5	1	0	1	3,9±0,1	112±10	434±2	893±5
6	0	0	0	3,7±0,1	74±0,5	334±2	728±8
7	0	1	-1	3,2±0,2	44±6	276±3,	671±4
8	-1	0	1	3,1±0,1	49±1	274±7	628±3
9	0	0	0	3,7±0,2	63±9	340±3	659±3
10	1	-1	0	3,9±0,1	92±5	350±5	863±7
11	0	0	0	3,7±0,2	83±3	345±12	738±5
12	1	0	-1	3,5±0,3	83±9	328±5	872±12
13	0	1	1	3,9±0,1	90±8	349±8	801±13
14	-1	1	0	3,0±0,2	55±0,4	255±8	522±8
15	-1	-1	0	2,5±0,1	68±6	248±5	480±11

Os valores naturais das variáveis independentes X1 (temperatura), X2 (Potência) e X3 (proporção de solventes).

Fonte: a autora (2021).

Segundo Chanioti e Tzia (2018) e Alrugaibah et al., (2021), a combinação dos DES com a extração assistida por ultrassom (UAE) provou ser bastante eficiente para a extração de antocianinas monoméricas totais. Baseado nisto, modelos matemáticos foram propostos para variáveis dependentes AMT, CFT, DPPH e ABTS para a extração assistida por ultrassom (Tabela 10). Todos os modelos foram significativos ($p < 0,05$), com coeficiente de determinação para AMT de $R^2 0,95$, CFT de $R^2 0,81$, DPPH de $R^2 0,87$ e ABTS de $R^2 0,94$, e não apresentaram falta de ajuste ($p > 0,05$), exceto para AMT. No entanto, como o $R^2_{ajd} > 0,92$, de acordo com Khajeh (2011) podem ser levadas em consideração devido à boa característica de previsão, mesmo o p-valor para falta de ajuste dando menor que 0,05. Os efeitos lineares positivos e

significativos para temperatura (X_1), potência (X_2) e concentração de DES cloreto de colina:ácido cítrico (X_3) permitiram um aumento na extração de todos os compostos estudados. Fenômeno esse que também pode ser observado nos gráficos de superfície de respostas (Figura 16).

A temperatura teve um efeito positivo significativo em consequência da permeabilidade das células vegetais, assim, aumenta a absorção de solvente e, conseqüentemente, a dissolução e solubilidade dos compostos (YUAN et al., 2018; HUANG et al., 2019). No entanto, a temperatura muito alta também pode levar à degradação das antocianinas termossensíveis (HUANG et al., 2019), como observado no presente estudo (capítulo 2). O efeito da potência da ultrassom no rendimento de extração segundo Heleno et al. (2016), também é um fator importante na extração de compostos alvos. Esse efeito positivo significativo acontece com a elevação da potência devido ao fenômeno da cavitação e aos efeitos da quebra molecular aumentando a extração dos compostos.

Nesse trabalho foram utilizadas concentrações de DES na solução aquosa inferior a 10%, pois mesmo em pequena quantidade, o DES tem efeito linear positivo significativo na extração. Segundo Dai et al., (2014) a transferência de massa entre as fases sólida e líquida é dificultada pela alta viscosidade do DES. Portanto, a adição de DES em água tem o objetivo de reduzir a viscosidade e o custo do processo, aumentando a extração de antocianinas e de compostos fenólicos. Entretanto, quando a quantidade de DES em água é pequena pode ocorrer o enfraquecimento das interações dos compostos de interesse com o solvente (KOU et al., 2019). Para antocianinas isso não seria um problema visto que a água juntamente com outros solvente é bastante usada para a sua extração, ajustando a polaridade da solução e melhorando a eficiência da extração (GUO et al., 2019).

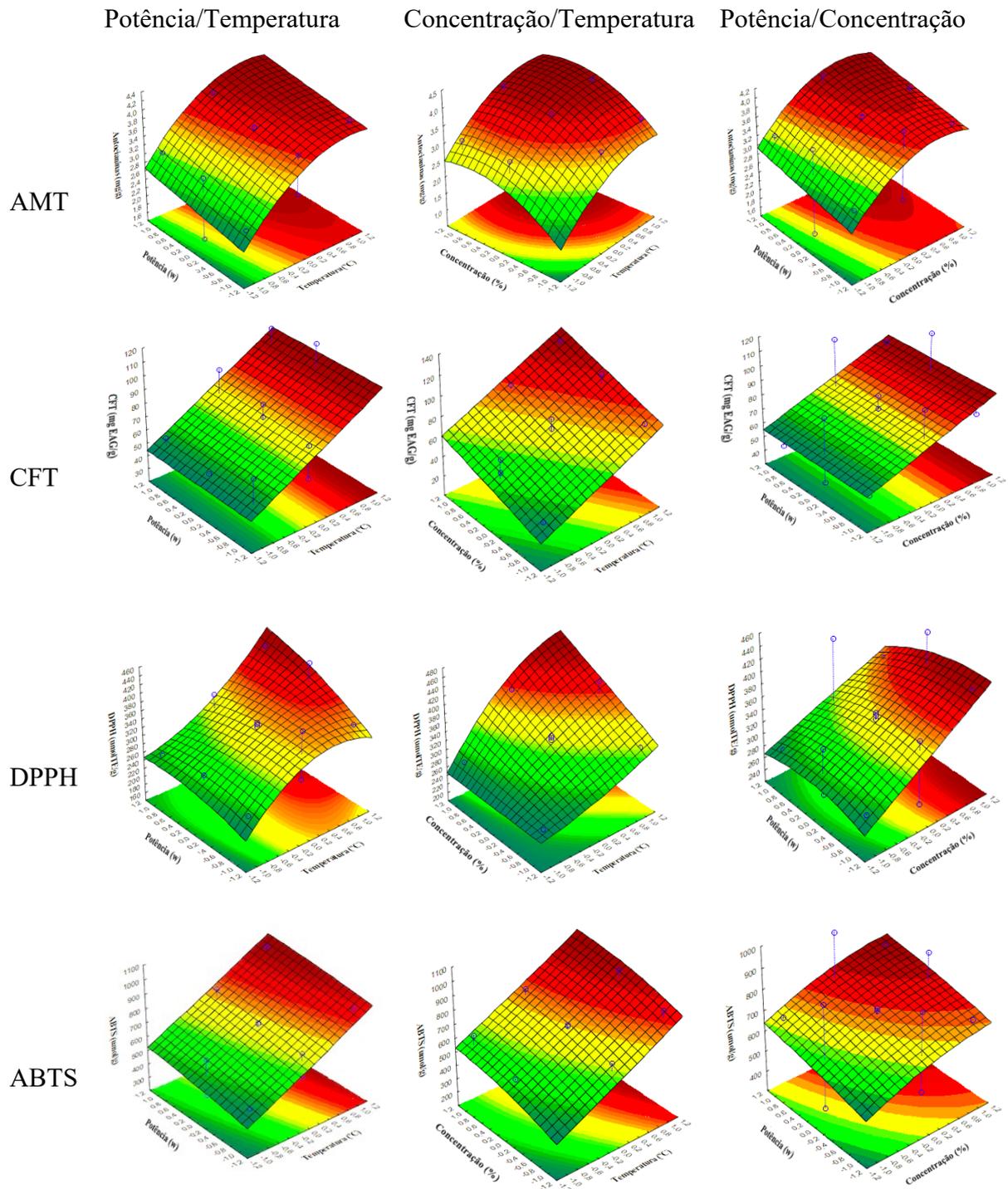
No entanto o efeito quadrático da temperatura (X_{11}) e potência (X_{22}) para AMT e temperatura (X_{11}) e concentração de solventes (X_{33}) para DPPH, foi negativo. Isso pode ser explicado devido ao aumento da taxa de extração de AMT e conseqüentemente o aumento da atividade antioxidante DPPH até um determinado ponto, onde depois passaram a ser reduzidos, possivelmente devido à degradação. Segundo López, et al., (2019), as antocianinas são suscetíveis à degradação, sendo muito instáveis a vários fatores, como temperatura, luz, pH entre outros. Para o DPPH além desses efeitos a interações também foi significativa, entre a temperatura e a potência (X_{12}), temperatura e proporção de solvente (X_{13}) e temperatura quadrática com proporção de solvente ($X_{11} X_3$) influenciou de maneira favorável, enquanto a interação potência e proporção de solvente (X_{23}) e temperatura quadrática com potência ($X_{11} X_2$) influenciou de maneira negativa.

Tabela 10 - Valores paramétricos da equação polinomial de segunda ordem, para cada método de extração e informações estatísticas do procedimento de ajuste do modelo.

Efeito		Extração assistida por ultrassom (UAE)			
		AMT	CFT	DPPH	ABTS
Interceptar	X ₀	3,742	71,829	335,913	708,516
Efeito linear	X ₁	0,646	23,021	62,295	198,806
	X ₂	0,431	13,884	46,498	71,165
	X ₃	0,174	ns	9,957	45,813
Efeito quadrático	X ₁₁	-0,358	ns	-10,762	ns
	X ₂₂	-0,345	ns	-10,680	ns
	X ₃₃	ns	ns	ns	ns
Efeito interativo	X ₁₂	ns	ns	21,419	ns
	X ₁₃	ns	ns	14,904	ns
	X ₂₃	ns	ns	-9,902	ns
	X ₁₁ X ₂	ns	ns	-14,638	ns
	X ₁₁ X ₃	ns	ns	28,568	ns
	X ₁ X ₃₃	ns	ns	ns	ns
Análise Estatística	FL (p – valor)	0,01	0,565	0,188	0,567
	R ²	0,949	0,807	0,871	0,944
	R ² _{adj}	0,920	0,775	0,849	0,929

AMT: antocianinas manoméricas totais; CFT: compostos fenólicos totais; potencial antioxidante por DPPH; potencial antioxidante por ABTS; ns: não significativo; FL: falta de ajuste; R²: coeficiente de determinação; R²_{adj}: coeficiente de determinação ajustado. X₁ (temperatura), X₂ (potência) e X₃ (proporção de solventes). Fonte: a autora (2021).

Figura 16 - Superfície de resposta para antocianinas monoméricas totais (AMT), compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante (DPPH e ABTS), obtidos pelo método UAE.

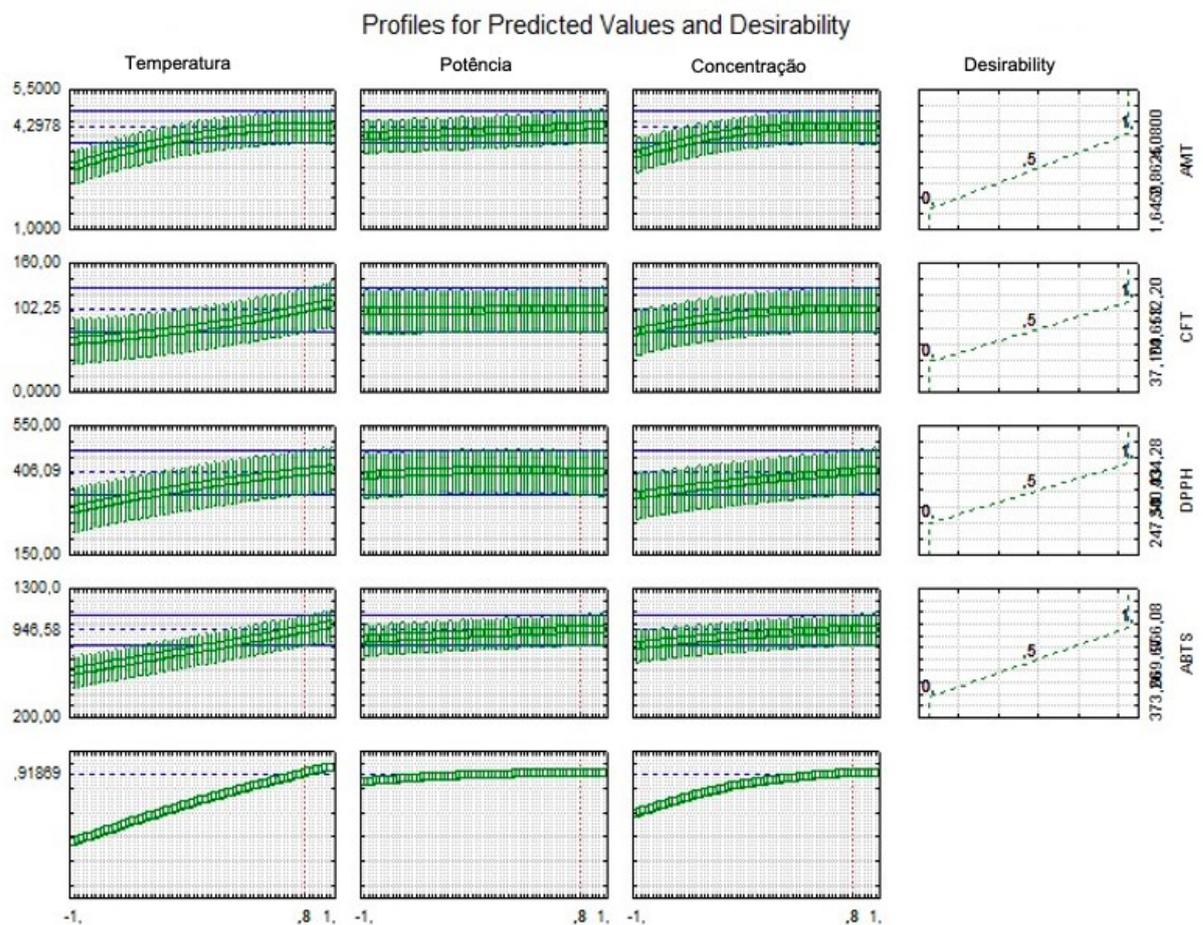


Fonte: a autora (2021).

A partir dos modelos de regressão que descreveram o processo de extração assistida por ultrassom, foi realizada uma otimização multi-resposta através da função desejabilidade, com

a função de encontrar um ponto ótimo de extração (Figura 17). Com mais de 91 % do objetivo atingido ($d = 0,9187$) o ponto ótimo de extração foram $T = 66 \text{ }^\circ\text{C}$, Potência = 420 W e concentração de DES (cloreto de colina:ácido cítrico) 8,2% adicionado a água. Além do ponto ótimo estimado, a sua confirmação e validação do método foi repetido o ensaio no ponto ótimo sugerido, e todos os valores observados apresentaram-se dentro do intervalo de 95 % de confiança para todas as variáveis (Tabela 11).

Figura 17 - Gráfico da desejabilidade obtido para as variáveis respostas AMT, CFT, DPPH e ABTS em função das variáveis independentes temperatura, concentração de solvente e potência.



Fonte: a autora (2021).

Tabela 11 - Valores preditos e experimentais das variáveis, no ponto ótimo da extração.

Variável	Valores				
	Predito*	- 95% confiança	+ 95% confiança	Experimental** UAE (8,2% de DES-ChCl:Ca)	Experimental** SWE (1% de DES-ChCl:Ca)
AMT (mg C3G.g⁻¹)	4,41	3,45	5,18	3,58	2,55
CFT (mg EAG.g⁻¹)	102,59	75,43	127,27	75,48	49,71
DPPH (μmol ET.g⁻¹)	409,12	396,52	421,72	406,45	377,09
ABTS (μmol ET.g⁻¹)	949,01	845,8	1049,68	891,63	521,22

AMT: Antocianinas monoméricas totais; CFT: compostos fenólicos totais; *Valores preditos para o modelo;

**Valores experimentais observados. Fonte: a autora (2021).

Por fim, os resultados obtidos por UAE mediante o emprego das condições otimizadas de processo (este capítulo) foram comparados com o desempenho da SWE (capítulo 2), também realizada nas condições ótimas de processo. O resultado desta comparação está apresentado na Tabela 11., que descreve as características dos extratos em termos de AMT, CFT, DPPH e ABTS, tanto para os valores preditos para os modelos como para os dados experimentais.

Através dos dados da Tabela 11 se observa que o método que apresentou melhor desempenho para a extração de todos os compostos estudados foi a UAE, com maior eficiência com relação as antocianinas monoméricas totais, aos compostos fenólicos e com relação às propriedades antioxidantes dos extratos, por DPPH e ABTS (Tabela 11). A SWE é um método que assim como UAE ocorre de maneira rápida. Entretanto, a técnica SWE por usar temperaturas um pouco mais elevada degrada os compostos termolábeis, que segundo Petersson et al., (2010), essa degradação é um problema potencial no uso de SWE.

A quantificação das antocianinas presentes nos extratos por LC-MS também mostrará que a UAE foi a técnica que obteve maior quantidades de antocianinas individuais presentes no tegumento de feijão (Tabela 7 e 17). Por fim, em comparação dos resultados obtidos pelos dois métodos de extração, o UAE foi escolhido para os próximos experimentos (Análise de estabilidade dos extratos, e análise de concentração) pois apresentou os maiores valores dos resultados e de acordo Chemat; Khan, (2011) e Chemat et al., (2017), umas das vantagens da UAE é a eficiência no processo mesmo em temperatura reduzidas, além de ser um método bastante simples.

3.3.3 Estabilidade dos extratos com cloreto de colina:ácido cítrico pelo método de UAE

- Efeito da temperatura

A Tabela 12 mostra os parâmetros cinéticos (constante da taxa de degradação de antocianinas (k), tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), valor D e coeficiente de temperatura (Q_{10})), para cada temperatura avaliada no extrato obtido por ultrassom em água adicionada de DES. As taxas de degradação de antocianinas aumentaram com o aumento da temperatura, com valores variando de 0,0004 a 0,005 min^{-1} para o extrato em DES e de 0,005 a 0,013 min^{-1} para o extrato em água.

Tabela 12 - Efeito da temperatura nos valores k , $t_{1/2}$, D e Q_{10} para degradação de antocianinas entre 60 a 90 ° C.

Extrato	T(°C)	$k(\text{min}^{-1})$	R^2	$t_{\frac{1}{2}}(\text{h})$	D(h)	Q10
8,2% de DES	60	0,0004	0,8951	28,88	95,94	2,50
	70	0,001	0,9584	11,55	38,38	3,00
	80	0,003	0,9699	3,85	12,79	1,67
	90	0,005	0,8141	2,31	7,68	
Água	60	0,005	0,9927	2,31	7,68	1,40
	70	0,007	0,9229	1,65	5,48	1,14
	80	0,008	0,9553	1,44	4,80	1,63
	90	0,013	0,8464	0,89	2,95	

Fonte: a autora (2021).

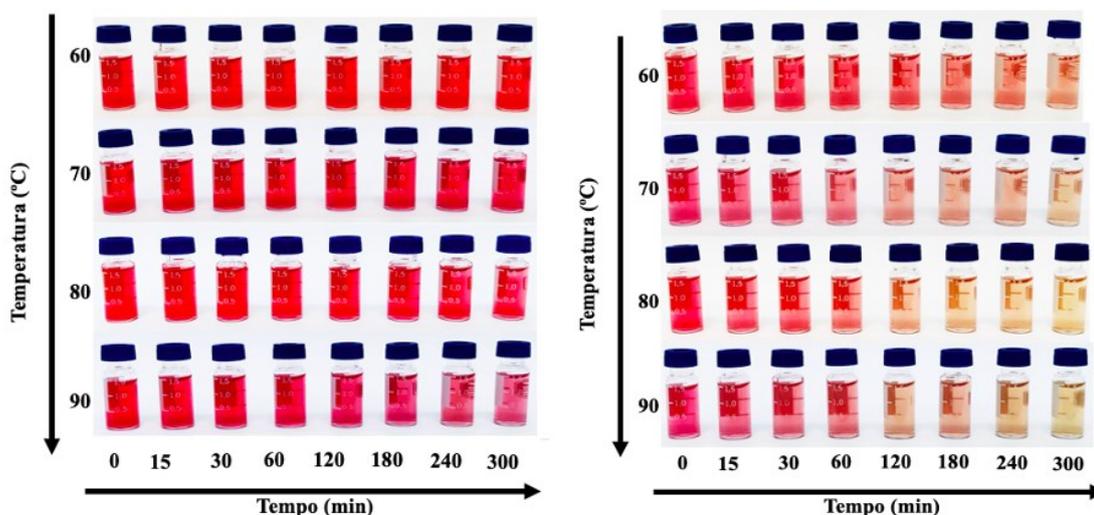
Como esperado, o processo de degradação foi intensificado com o aumento da temperatura para ambos extratos. Diferenças foram observadas entre as constantes da taxa de aquecimento do extrato com DES quando comparado com o extrato com água nas mesmas temperaturas. Durante o processo de aquecimento foi observada uma degradação das antocianinas menor para o extrato com DES comparado com o uso de água como solvente nas mesmas temperaturas de extração. Isso indica que o solvente em que o extrato encontra-se, afeta a taxa de degradação das antocianinas durante o aquecimento. O tempo necessário para a redução de 50% das antocianinas ($t_{1/2}$) também foi maior para os extratos com DES. Por exemplo, na temperatura de 60 °C um tempo de aproximadamente 12 vezes maior o extrato com DES quando comparado com extrato que contem apenas água. O mesmo comportamento foi verificado para os tempos de redução decimal. Esse comportamento também foi observado por Mercali et al., (2013), onde o valor dos parâmetros diminuiu com o acréscimo de temperatura, para os extratos avaliados. O processo degradativo se intensifica à medida que a temperatura aumenta, por isso é justificável que o tempo para que ocorra a redução na concentração inicial seja maior para as temperaturas mais baixas.

Como observado nos resultados, o extrato em DES apresentou a maior estabilidade das antocianinas quando comparado com o extrato com água. A hipótese para a maior estabilidade nos DES é devido ao estabelecimento de extensas ligações de hidrogênio entre as antocianinas e os componentes dos DES (DAI et al., 2014). Segundo Dai e seus colaboradores (2016), os extratos das pétalas de *Catharanthus roseus* extraídos com DES também apresentaram maior estabilidade quando comparados com outro tipo de solvente (etanol acidificado com ácido fórmico) explicando novamente que a eficiência da estabilidade está relacionada com ligações de hidrogênio entre as antocianinas e os componentes dos DES.

Os valores de Q10 demonstraram diferenças claras na sensibilidade térmica entre as antocianinas extraídas com 8,2% de DES da extração com água. O valor Q10 obtido para as antocianinas extraídas com água foi inferior ao obtido para as antocianinas extraídas com 8,2% de DES. Os valores de Q10 apresentaram diferença entre os extratos de antocianinas analisados, isso se deve ao fato de que as constantes de degradação térmica foram diferentes para cada extrato analisado. Além disso os solventes utilizados nos extratos são diferentes, e as antocianinas predominantes nesses extratos podem influenciar no equilíbrio da reação, alterando a constante de degradação térmica. Segundo Kechinski et al., (2010), valores mais altos de Q10 é obtido em temperaturas baixas, como pode ser observado na tabela 12, na faixa de 60 °C com 8,2% de DES obteve valores alto do coeficiente de temperatura quando comparado nessa mesma faixa de temperatura só que extrato com água. Além desses parâmetros

calculados a degradação também foi observada pela formação de pigmentos de coloração marrom em extratos com apenas água, mostraram que o DES mesmo em pequena quantidade consegue preservar as antocianinas (Figura 18).

Figura 18 - Efeito do aquecimento nas temperaturas de 60, 70, 80 e 90 °C ao longo do tempo na estabilidade do extrato aquoso de antocianinas, utilizando 8,2% de DES e água.



Fonte: a autora (2021).

Os valores de energia de ativação (E_a) para o extrato em 8,2% de DES e extrato com apenas água foram de $87,38 \text{ kJ mol}^{-1}$ (R^2 0,9815) e $30,05 \text{ kJ mol}^{-1}$ (R^2 0,9555), respectivamente. Os resultados mostram que os extratos ricos em antocianinas em DES necessitam de mais energia para ativar a reação de degradação térmica. Este comportamento indica um processo de degradação mais lento, que precisa de uma maior energia de ativação para os extratos em DES quando comparados com antocianinas extraídas com apenas água (PERON et al., 2017). A magnitude da energia de ativação é um excelente indicador da sensibilidade da reação à temperatura. De acordo com Heldman (2011), as constantes de energia de ativação para a degradação de antocianinas variam de 30 a 125 kJ mol^{-1} .

Tabela 13 - Parâmetros termodinâmicos obtidos para a degradação de antocianinas durante o aquecimento.

Solventes nos extratos	T(°C)	ΔH (kJ.mol ⁻¹)	ΔG (kJ.mol ⁻¹)	ΔS (J.mol ⁻¹ .K ⁻¹)
8,2% DES	60	84,6	195,2	-332,1
	70	84,5	198,6	-332,4
	80	84,4	201,2	-330,7
	90	84,4	205,4	-333,5
Água	60	27,3	188,2	-483,3
	70	27,2	193,0	-483,4
	80	27,1	198,3	-485,0
	90	27,0	202,6	-483,5

Fonte: a autora (2021).

A Tabela 13 mostra os resultados de entalpia de ativação, energia livre de Gibbs e entropia de ativação, para degradação dos extratos ricos em antocianinas do tegumento de feijão preto em cada temperatura. Como pode ser observado para ambos os extratos, a entalpia de ativação (ΔH) é positiva, o que indica um estado endotérmico, com maiores taxas de degradação com o aumento da temperatura. A diminuição observada em ΔH do extrato com apenas água quando comparado com o extrato com 8,2% de DES, indica que a barreira de energia para quebrar as ligações é menor. Sendo mais fácil ocorrer a degradação das antocianinas no extrato com água do que o extrato com 8,2% de DES (MERCALI et al., 2013).

A energia livre de Gibbs (ΔG) representa a espontaneidade da reação, nesse estudo pode-se observar que os valores foram semelhantes para ambos os extratos, com valores positivos em todas as temperaturas. De acordo com Peron et al. (2017) e Georgieva et al., (2012), isso indica que a reação de degradação da antocianina não é espontânea, resultado já esperado, visto que é aplicado temperaturas elevadas para a degradação. A entropia de ativação (ΔS) mede a mudança de desordem das moléculas, nesse estudo foram encontrados valores de ΔS negativo, para ambos extratos, indicando que antocianinas são reorganizadas durante o processo de degradação (GEORGIEVA et al., 2012; MOLAEAFARD; JAMEI; MARJANI, 2021).

Com isso, observou-se que os extratos em 8,2% de DES e com apenas água apresentaram valores diferentes para todos os parâmetros cinéticos e termodinâmicos (quando comparados na mesma temperatura), indicando que as antocianinas tem degradação diferente durante a estabilidade.

- Efeito da luz na estabilidade dos extratos aquosos de antocianinas do tegumento do feijão

Na Tabela 14 são apresentadas as constantes de taxa de degradação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da reação de degradação das antocianinas em relação à incidência de luz nos extratos. Os coeficientes de determinação (R^2) apresentaram valores de 0,8824 para o extrato em DES e 0,9620 para o extrato controle em água.

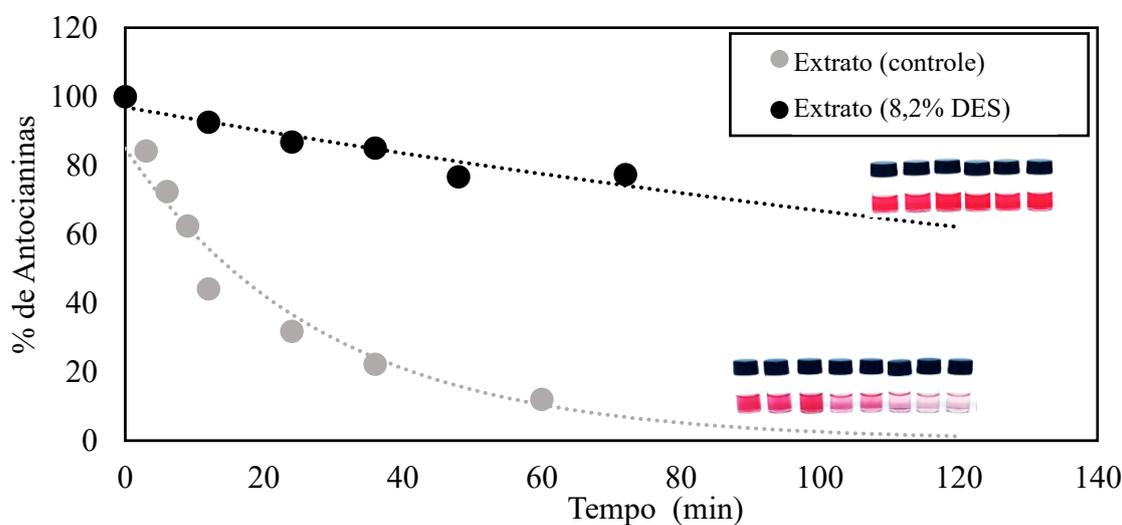
Tabela 14 - Parâmetros cinéticos do efeito da luz na estabilidade dos extratos de antocianinas do tegumento de feijão preto.

Extratos	k (dia⁻¹)	R²	t_{1/2}(dia)
8,2% de DES	0,004	0,8824	3
Controle (água)	0,035	0,9620	0,3

Fonte: a autora (2021).

A degradação pode ser observada nas regressões, seguindo a cinética da reação de primeira ordem nos extratos do tegumento de feijão preto (Figura 19). Esses resultados mostraram que a degradação dos compostos foi menor nos extratos em 8,2% de DES em comparação com os extratos controles. A taxa de degradação (k) foi menor para os extratos com DES (0,004 dia⁻¹) em relação aos controles (0,035 dia⁻¹), apresentando tempo de meia vida dez vezes maior para os extrados com DES (Tabela 14). O resultado da estabilidade dos extratos controle reduziram aproximadamente 70% nas primeira 24 horas, podendo observar alteração da cor de rosa-avermelhada para rosa claro, os extratos com DES apresentaram uma coloração rosa-avermelhada do início ao fim da análise. Segundo Dai et al., (2014) os DES melhoram a estabilidade dos compostos sob diversas condições, como alta temperatura e tempo de armazenamento, se comparado à água e etanol, além disso, também foram observados uma maior estabilidade dos extratos com DES quando exposto à luz solar em condições ambientais.

Figura 19 - Efeito da exposição à luz na estabilidade dos extratos de antocianinas em 8,2% de DES e extratos em água do tegumento de feijão preto.



Fonte: a autora (2021).

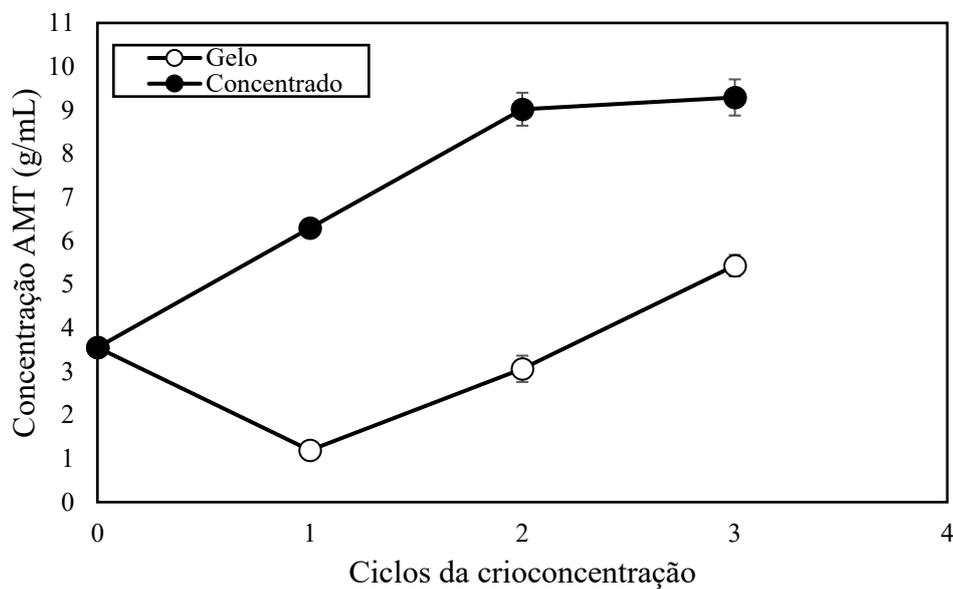
3.3.4 Crioconcentração dos extratos ricos em antocianinas

Geralmente a concentração de extratos é realizada usando a operação unitária de evaporação. No entanto, os solventes eutéticos profundos apresentam baixa pressão de vapor, o que dificulta a remoção da água dos extratos (NIKNADDAF et al., 2018; HANSEN, et al., 2020). Além disso, as antocianinas são sensíveis aos processos térmicos, por esse motivo, tecnologias que não usam altas temperaturas são necessárias. Buscando alternativas para a concentração de extratos com DES, foi proposta a crioconcentração em blocos assistida por centrifugação. O processo aplica baixas temperaturas, onde o extrato é congelado e posteriormente centrifugado para remover a água e obter o concentrado. Tecnologias assistidas na crioconcentração consegue preservar ao máximo as características funcionais e nutricionais dos extratos, além de ser muito eficiente na concentração (SÁNCHEZ et al., 2010; LAZZAROTTO et al., 2017).

A figura 20 demonstra a quantidade de antocianinas (g/mL) do concentrado (C_C) e da fração de gelo (C_i) em cada ciclo de crioconcentração do extrato. Ao aumentar o número de ciclos, os teores de antocianinas na fração concentrada aumentaram, atingindo valores de 6,28, 9,02 e 9,29 g/mL no primeiro, segundo e terceiro ciclos de crioconcentração, respectivamente. No terceiro ciclo houve um aumento de aproximadamente 2,6 vezes da concentração inicial de antocianinas monoméricas totais. A quantidade de antocianinas remanescentes na fração de

gelo separada foram de 1,19, 3,05, e 5,43 g/mL de antocianinas no primeiro, segundo e no terceiro ciclos de crioconcentração. A evolução ao longo dos ciclos de crioconcentração do extrato era esperada, visto que em vários estudos foram relatados comportamentos semelhantes, como na crioconcentração de sucos (PETZOLD et al., 2015) soro de leite (AIDER et al., 2009) e sucos de cereja e damasco (AIDER e HALLEUX, 2008).

Figura 20 - Evolução do teor de antocianinas monoméricas totais do concentrado e da fração de gelo em função do ciclo de crioconcentração de extrato de antocianinas.



Fonte: a autora (2021).

Foi observado um aumento progressivo da porcentagem de concentrado ao longo dos ciclos, chegando a 85% (Tabela 15), valor maior que os dos sucos relatado por Petzold et al., (2015). Com relação a eficiência, observa-se efeito oposto no percentual de concentrado, de forma semelhante às pesquisas de Petzold et al., (2015) e Petzold e Aguilera (2013). Segundo Petzold et al., (2015), este efeito é explicado por um aumento na concentração inicial em cada ciclo, tendo uma maior concentração de solutos no concentrado com maior viscosidade o que dificulta a retirada de apenas água nas próximas etapas, por isso a eficiência vai diminuindo. Uma das maiores vantagens desse processo é que ele pode ser realizado em ambiente fechado e escuro levando a preservação dos compostos que são sensíveis a exposição à luz e temperatura, reduzindo a degradação (PETZOLD et al., 2015; AIDER et al., 2009; AIDER e HALLEUX, 2008).

Tabela 15 - Solute recuperado, gelo, porcentagem de concentrado e eficiência.

Extrato e ciclo de crioconcentração	Concentração de antocianinas no concentrado (g/mL)	Concentração de antocianinas no gelo (g/mL)	Porcentagem de concentrado (%)	Eficiência (%)
Extrato	3,55 ± 0,14	-	-	-
1	6,29 ± 0,10	1,19 ± 0,10	49,07	80,98
2	9,02 ± 0,58	3,06 ± 0,58	51,69	66,12
3	9,29 ± 0,42	5,43 ± 0,42	85,83	41,61

Fonte: a autora (2021).

Uma validação do processo de crioconcentração foi realizada entre os resultados encontrados para as relações de massa de gelo experimental (W_e) e previsto (W_p) (Tabela 16). Um bom ajuste, com RMS de 1,72 a 5,10 foi observado para as etapas de crioconcentração estudadas. Esses valores de RMS foram inferiores aos dos trabalhos de Petzold et al., (2016), Sánchez et al., (2010) e Hernández et al., (2010), comprovando assim a validação.

Tabela 16 - Solute recuperado, gelo, porcentagem de concentrado e eficiência.

Extrato e ciclo de crioconcentração	Concentração de antocianinas no concentrado (g/mL)	Concentração de antocianinas no gelo (g/mL)	W_p (g/g)	W_e (g/g)	RMS (%)
Extrato	3,55 ± 0,14	-	-	-	-
1	6,29 ± 0,10	1,19 ± 0,10	0,54	0,51	2,02
2	9,02 ± 0,58	3,06 ± 0,58	0,46	0,48	1,72
3	9,29 ± 0,42	5,43 ± 0,42	0,07	0,14	5,10

Fonte: a autora (2021).

3.3.5 Quantificação das antocianinas presentes nos extratos por HPLC

Depois da otimização por UAE (obtidos no ponto ótimo da extração) e do processo de concentração dos extratos por crioconcentração, foram realizadas a identificação das antocianinas individuais por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (Tabela 17), assim como para os extratos obtidos por SWE no capítulo 2. As mesmas antocianinas

principais foram identificadas por seus respectivos íons (delfinidina-3-O-glicosídeo [M +] 465,1 petunidina-3-O-glicosídeo [M +] 479,12 e malvidina-3-O-glicosídeo [M +] 493,13), visto que essas são as principais antocianinas encontradas no feijão preto (MOJICA et al., 2017).

Além da tecnologia por UAE mostrar ser eficiente na extração das antocianinas monoméricas totais, quando comparada com as outras tecnologias de extração realizadas no trabalho (ME e SWE), os extratos por UAE também mostraram ser mais adequados em relação a SWE, contendo maiores quantidades de antocianinas individuais. Visto que, os extratos extraídos por UAE apresentaram maior eficiência, foi realizada uma concentração por crioconcentração, obtendo valores satisfatórios das antocianinas individuais em relação ao valor inicial, sendo de 11 vezes maior para para Delfinidina-3-O-glicosídeo, 8 vezes para Petunidina-3-O-glicosídeo e 7 vezes para Malvidina-3-O-glicosídeo. Confirmando assim a eficácia desse processo de concentração. Alguns autores também relataram esse benefício da crioconcentração, como Aider et al., (2008) e Petzold et al., (2015), que definiram o método como promissor para a produção de alimentos líquidos concentrados com alta qualidade sem que ocorra a degradação.

Tabela 17 - Concentrações de antocianinas monoméricas individuais determinadas por HPLC dos extratos UAE e concentrados.

Antocianinas	Concentração dos extratos UAE				
	Extrato	Extrato	Extrato	Extrato	Extrato
	(mg/g)	(mg/mL)	Concentrado 1 (mg/mL)	Concentrado 2 (mg/mL)	Concentrado 3 (mg/mL)
Delfinidina-3-O-glicosídeo	3,41	1,54	6,74	11,53	17,50
Petunidina-3-O-glicosídeo	2,90	1,31	3,83	6,52	10,02
Malvidina-3-O-glicosídeo	1,66	0,75	1,91	3,28	5,01
Total	7,98	3,59	12,49	21,33	32,54

Fonte: a autora (2021).

3.4 CONCLUSÃO

A combinação de solventes eutéticos profundos com a tecnologia assistida por ultrassom (UAE), foi eficiente para a recuperação de extratos ricos em antocianinas, provenientes dos tegumentos de feijões de baixo valor de mercado. As condições ideais para maximizar a extração foram com soluções aquosas de cloreto de colina:ácido cítrico a 8,2 %, temperatura de extração de 66 °C e potência de 420 W. A comparação entre UAE e SWE (capítulo 2) mostrou que UAE conseguiu produzir extratos com maiores valores para todos os compostos estudados, quando comparado com o ponto ótimo de extração obtidos por SWE. Sendo estes, de aproximadamente 40% a mais para antocianinas monoméricas totais (AMT), 52% a mais para os compostos fenólicos totais (CFT) e maior potencial antioxidante (AA), sendo de 53% a mais para o método DPPH e 71% para ABTS. Mostrando que o solvente DES cloreto de colina:ácido cítrico juntamente com a técnica UAE é adequada para extração desses compostos. Os extratos recuperados com soluções de DES em UAE mostraram maior proteção as AMT em temperaturas elevadas e a luz, comparado com àqueles obtidos usando apenas água como solvente. Além da análise de estabilidade para comprovar a proteção dos pigmentos em DES, um outro desafio foi a concentração dos extratos sem que ocorra degradação das AMT. Para isto, o método de crioconcentração em blocos assistido por centrifugação foi realizado e após o terceiro ciclo de crioconcentração, um aumento de aproximadamente 3 vezes de AMT foi observado, chegando a 86% do percentual de concentrado. As tecnologias de extração, concentração e uso de solventes alternativos mostraram ser eficientes em termos quantitativos e de qualidade dos extratos, diminuindo o tempo e a energia necessária para os processos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho apresentou técnicas para a valorização de um subproduto, derivado do feijão preto, mostrando que o uso dos tegumentos dessa semente na extração de compostos bioativos pode ser bastante promissor. Os diferentes métodos de extração utilizando solventes DES, permitiram avaliar a influência das técnicas afim de obter melhores condições de extração. A triagem preliminar por maceração dos 5 diferentes solventes eutéticos profundos (DES), permitiu identificar a concentração e o solvente que melhor extraiu as antocianinas monoméricas totais.

Dentre os avaliados, o cloreto de colina:ácido cítrico foi o mais adequado para o processo. O extrato rico em antocianinas obtido por UAE, utilizando esse solvente, em condições otimizadas de temperatura, potência e concentração se mostrou eficaz na recuperação de compostos antioxidantes retidos no subproduto do feijão. Já o extrato obtido por SWE não foi tão adequado quando comparado com UAE, devido a possível degradação dos compostos causada pela temperatura.

As principais antocianinas encontradas no feijão preto (delfinidina-3-O-glicosídeo, petunidina-3-O-glicosídeo e malvidina-3-O-glicosídeo) tem grandes vantagens na pesquisa, podendo ser usadas em várias aplicações. Neste trabalho foi possível combinar a extração de antocianinas do tegumento de feijão com soluções aquosas de DES, além de uma adequada concentração pelo processo de crioconcentração. Diante disso, a utilização destes extratos como corante natural com ação antioxidante pode ser apropriada para adição em diferentes matrizes alimentares.

PROPOSTAS DE TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a estabilidade dos extratos por SWE.
- Com a condição ótima obtida por água subcrítica, avaliar a influência de outros parâmetros, como relação sólido-líquido, tamanho de partícula, tipo do método de extração (estático ou dinâmico), entre outros, nas mesmas respostas.
- Verificação se a técnica por micro-ondas é adequada quanto a ultrassom para a extração de antocianinas presentes no tegumento de feijão.
- Aplicar o extrato como corante natural em uma matriz de alimentos, e avaliar a atividade antioxidante neste sistema e degradação dos pigmentos.
- Avaliar o potencial antioxidante *in vivo* dos extratos em uma matriz de alimentos.

REFERÊNCIAS

AGU, C. M.; MENKITI, M. C.; EKWE, E. B.; AGULANNA, A. C. Modeling and optimization of Terminalia catappa L. kernel oil extraction using response surface methodology and artificial neural network. **Artificial Intelligence in Agriculture**, v. 4, p. 1-11, 2020.

AHMED, W.; AZMAT, R.; MEHMOOD, A.; QAYYUM, A.; KHAN, A. L. M.; NAZ, S. A análise de novos compostos bioativos operativos superiores e grupo Químico Funcional de plantas herbais através de UF-HPLC-DAD e métodos de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier e sua atividade biológica com processo de potencial antioxidante como futuro ensaio químico verde. **Arabian Journal of Chemistry**, p. 102935, 2020.

AIDER, M.; HALLEUX, D. Cryoconcentration technology in the bio-food industry: Principles and applications. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, n. 3, p. 679-685, 2009.

AIDER, M.; HALLEUX, D.; AKBACHE, A. Whey cryoconcentration and impact on its composition. **Journal of Food Engineering**, v. 82, n. 1, p. 92-102, 2007.

AIDER, M.; HALLEUX, D.; MELNIKOVA, I. Gravitational and microwave-assisted thawing during milk whey cryoconcentration. **Journal of Food Engineering**, v. 88, n. 3, p. 373-380, 2008.

AIDER, M.; HALLEUX, D. Production of concentrated cherry and apricot juices by cryoconcentration technology. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 10, p. 1768-1775, 2008.

ALBERTI, A.; ZIELINSKI, A. A. F.; ZARDO, D. M.; DEMIATE, I. M.; NOGUEIRA, A.; MAFRA, L. I. Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. **Food chemistry**, v. 149, p. 151-158, 2014.

ALBUQUERQUE, B. R.; PINELA, J.; BARROS, L.; OLIVEIRA, M. B. P.; FERREIRA, I. C. Anthocyanin-rich extract of jaboticaba epicarp as a natural colorant: Optimization of heat-and ultrasound-assisted extractions and application in a bakery product. **Food Chemistry**, 316, 126364, 2020.

ALBUQUERQUE, B. R.; PRIETO, M. A.; VÁZQUEZ, J. A.; BARREIRO, M. F.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. Recovery of bioactive compounds from *Arbutus unedo* L. fruits: Comparative optimization study of maceration/microwave/ultrasound extraction techniques. **Food Research International**, v. 109, p. 455-471, 2018.

ALRUGAIBAH, M.; YAGIZ, Y.; GU, L. Use natural deep eutectic solvents as efficient green reagents to extract procyanidins and anthocyanins from cranberry pomace and predictive modeling by RSM and artificial neural networking. **Separation and Purification Technology**, v. 255, p. 117720, 2021.

ALFARO D. A.; URÍAS S. J. E.; LOARCA P. G.; GAYTAN M. M.; PRADO R. R.; MOJICA, L. Techno-functional properties of thermally treated black bean protein concentrate generated through ultrafiltration process. **LWT**, v. 136, p. 110296, 2020.

ANDRADE, E. T. D.; CORRÊA, P. C.; MARTINS, J. H.; ALVARENGA, E. M. Avaliação de dano mecânico em sementes de feijão por meio de condutividade elétrica. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 3, n. 1, p. 54-60, 1999.

AOAC - Association of Official Analytical Chemist (20 Ed), official methods of analysis from AOAC International, Gaithersburg, MD, 2016.

ASHOKKUMAR, M.; SUNARTIO, D.; KENTISH, S., MAWSON, R.; SIMONS, L.; VILKHU, K.; VERSTEEG, C. K. Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: a preliminary study on a model system. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 9.2: 155-160, 2008.

ASHENGROPH, M.; NAHVI, I.; AMINI, J. Application of Taguchi design and Response surface methodology for improving conversion of isoeugenol into vanillin by resting cells of *Psychrobacter* sp. CSW4. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 12, n. 3, p. 411, 2013.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, 117.4: 426-436, 2013.

BACKES, E.; PEREIRA, C.; BARROS, L.; PRIETO, M. A.; GENENA, A. K.; BARREIRO, M. F.; FERREIRA, I. C. Recovery of bioactive anthocyanin pigments from *Ficus carica* L. peel by heat, microwave, and ultrasound based extraction techniques. **Food Research International**, v. 113, p. 197-209, 2018.

BAJKACZ, S; ADAMEK, J. Evaluation of new natural deep eutectic solvents for the extraction of isoflavones from soy products. **Talanta**, v. 168, p. 329-335, 2017.

BELHACHAT, D.; MEKIMENE, L.; BELHACHAT, M.; FERRADJI, A.; AID, F. Application of response surface methodology to optimize the extraction of essential oil from ripe berries of *Pistacia lentiscus* using ultrasonic pretreatment. **Journal of applied research on medicinal and aromatic plants**, v. 9, p. 132-140, 2018.

BENVENUTTI, L.; CAMARGO, A. D. P. S.; ZIELINSKI, A. A. F.; FERREIRA, S. R. S. NADES as potential solvents for anthocyanin and pectin extraction from *Myrciaria cauliflora* fruit by-product: In silico and experimental approaches for solvent selection. **Journal of Molecular Liquids**, v. 315, p. 113761, 2020.

BI, W.; TIAN, M.; ROW, K. H. Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. **Journal of Chromatography A**, v. 1285, p. 22-30, 2013.

BI, Y.; CHI, X.; ZHANG, R.; LU, Y.; WANG, Z.; DONG, Q.; JIANG, L. Highly efficient extraction of mulberry anthocyanins in deep eutectic solvents: Insights of degradation kinetics and stability evaluation. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 66, p. 102512, 2020.

BIMAKR, M.; GANJLOO, A.; ZARRINGHALAMI, S.; ANSARIAN, E. Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from *Malva sylvestris* leaves and its comparison with agitated bed extraction technique. **Food science and biotechnology**, 26.6: 1481-1490, 2017.

BOSILJKOV, T.; DUJMIĆ, F.; BUBALO, M. C.; HRIBAR, J.; VIDRIH, R.; BRNČIĆ, M., JOKIĆ, S. Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches

for extraction of wine lees anthocyanins. **Food and Bioproducts Processing**, v. 102, p. 195-203, 2017.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. American Society for Quality Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables Society for Quality Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/1266454> Your use of the JSTOR archive indicates your acceptance of the Terms & Conditions of Use. **Technometrics**, v. 2, n. 4, p. 455– 475, 1960.

BRAGA, M. B.; VEGGI, P. C.; CODOLO, M. C.; GIACONIA, M. A.; RODRIGUES, C. L.; BRAGA, A. R. C. Evaluation of freeze-dried milk-blackberry pulp mixture: Influence of adjuvants over the physical properties of the powder, anthocyanin content and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 125, p. 108557, 2019.

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

BRASIL. AGEITEC - Agência Embrapa de Informação Tecnológica. **Beneficiamento do feijão**. 2012. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/feijao/arvore/CONTAG01_2_262003151355.html#> Acesso em: 22 jan. 2020.

BRIGIDE, P.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Aaliação dos efeitos da cocção e irradiação na composição do feijão carioca (*phaseolus vulgaris l.*) Evaluation of cooking and irradiation effects on the composition of carioca bean (*Phaseolus vulgaris L.*). **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 22, n. 1, p. 97-102, 2011.

BRUNNER, G. Gas Extraction: An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation process. Darmstadt: **Steinkopff**, v. 4, p. 387, 1994.

BRUNS, R. E.; SCARMINO, I.S.; BARROS NETO, B. **Statistical desing – chemometrics**. Amsterdam: Elsevier, 2006.

BUBALO, M. C.; ĆURKO, N.; TOMAŠEVIĆ, M.; GANIĆ, K. K.; REDOVNIKOVIĆ, I. R. Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. **Food chemistry**, v. 200, p. 159-166, 2016.

CALLAO, M. Pilar. Multivariate experimental design in environmental analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 62, p. 86-92, 2014.

CAMPOS, M. R. S.; RODRÍGUEZ, K. G.; RUIZ, J. C. R.; GUERRERO, L. C.; ANCONA, D. B. Effect of Incorporation of Hard-to-Cook Bean (*P haseolus vulgaris* L.) Protein Hydrolysate on Physical Properties and Starch and Dietary Fiber Components of Semolina Pasta. **Journal of food processing and preservation**, v. 39, n. 6, p. 1159-1165, 2015.

CAROCHO, M.; BARREIRO, M. F.; MORALES, P.; & FERREIRA, I. C. Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 13.4: 377-399, 2014.

CAVALCANTI, R. N. Extração de antocianinas de resíduo de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) utilizando líquido pressurizado e fluido supercrítico: caracterização química, avaliação econômica e modelagem matemática. **Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)** – Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP. 2013.

CHANIOTI, S; TZIA, C. Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 48, p. 228-239, 2018.

CHEMAT, F.; KHAN, M. K. Aplicações do ultrassom na tecnologia de alimentos: processamento, preservação e extração. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 18, n. 4, pág. 813-835, 2011.

CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A. G.; MEULLEMIESTRE, A.; FABIANO, A. S.; A BERT, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics sonochemistry**, 34: 540-560, 2017.

CHEN, F.; SUN, Y.; ZHAO, G.; LIAO, X.; HU, X.; WU, J.; WANG, Z. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. **Ultrasonics Sonochemistry**, 14.6 767-778, 2007.

CHEN, P. N.; CHU, S. C.; CHIOU, H. L.; KUO, W. H.; CHIANG, C. L.; HSIEH, Y. S. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3- glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. **Cancer Letters**, v. 235, n. 2, p. 248–259, 2006.

DAI, Y.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). **Food chemistry**, 159: 116-121, 2014.

DAI, Y.; ROZEMA, E.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. **Journal of Chromatography A**, v. 1434, p. 50-56, 2016.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214–219, 1980.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International journal of food science & technology**, v. 35, n. 1, p. 5-22, 2000.

DZAH, C. S.; DUAN, Y.; ZHANG, H.; BOATENG, N. A. S.; MA, H. Últimos desenvolvimentos na recuperação e purificação de polifenóis de subprodutos de plantas: uma revisão. **Trends in Food Science & Technology**, v. 99, p. 375-388, 2020.

EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e extensão Rural de Santa Catarina. 2012 Disponível em: <http://docente.ifsc.edu.br/roberto.komatsu/MaterialDidatico/Agroecologia_4%C2%B0M%C3%B3duloGr%C3%A3os/Feijao/informacoes_tecnicas_cultivo_feijao.pdf > Acesso em: 29 jan. 2021.

ESSIEN, S. O.; YOUNG, B.; BAROUTIAN, S. Recent advances in subcritical water and supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from plant materials. **Trends in Food Science & Technology**, v. 97, p. 156-169, 2020.

FAOSTAT – Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>> Acesso em: 22 jan. 2021.

FALLAH, A. A.; SARMAST, E.; JAFARI, T. Efeito das antocianinas na dieta sobre os biomarcadores do controle glicêmico e do metabolismo da glicose: uma revisão sistemática e meta-análise de ensaios clínicos randomizados. **Food Research International**, p. 109379, 2020.

FENG, R.; WANG, S. Y.; SHI, Y. H.; FAN, J.; YIN, X. M. A. Delfinidina induz necrose nas células do carcinoma hepatocelular na presença de 3-metiladenina, um inibidor da autofagia. **Jornal de química agrícola e alimentar**, v. 58, n. 7, pág. 3957-3964, 2010.

FERREIRA, C. D.; ZIEGLER, V.; LINDEMANN, S. I.; HOFFMANN, J. F.; VANIER, N. L.; DE OLIVEIRA, M. Quality of black beans as a function of long-term storage and moldy development: Chemical and functional properties of flour and isolated protein. **Food chemistry**, v. 246, p. 473-480, 2018.

FERREIRA, S. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; SANTOS, W. N. L. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica chimica acta**, v. 597, n. 2, p. 179-186, 2007.

FILHO, J. G. O.; BRAGA, A. R. C.; OLIVEIRA, B. R.; GOMES, F. P.; MOREIRA, V. L.; PEREIRA, V. A. C.; EGEA, M. B. O potencial das antocianinas em filmes baseados em polímeros ecologicamente corretos, ativos e bioativos: uma revisão. **Food Research International**, p. 110202, 2021.

FROTA, K. M. G.; SOARES, R. A. M.; ARÊAS, J. A. G. Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 2, p. 470-476, 2008.

FU, X.; WANG, D.; BELWAL, T.; XIE, J.; XU, Y.; LI, L.; ZOU, L.; ZHANG, L.; LUO, Z. O solvente eutético natural profundo melhorou a extração assistida por ultrassonicação de pulso como uma estratégia verde eficiente e protetora multiestabilidade para extrair antocianina do bagaço de mirtilo. **LWT**, p. 111220, 2021.

GARCÍA M. M.; RIVAS G. J. C.; IBÁÑEZ E.; GARCÍA M. C. Recuperação de catequinas e proantocianidinas de subprodutos vinícolas por extração subcrítica de água. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, n. 1-2, pág. 44-50, 2006.

GAN, R. Y.; DENG, Z. Q.; YAN, A. X.; SHAH, N. P.; LUI, W. Y.; CHAN, C. L.; CORKE, H. Pigmented edible bean coats as natural sources of polyphenols with antioxidant and antibacterial effects. **Lwt**, v. 73, p. 168-177, 2016.

GEORGIEVA, V.; ZVEZDOVA, D.; VLAEV, L. Non-isothermal kinetics of thermal degradation of chitosan. **Chemistry Central Journal**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2012.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, v. 00, n. 1, p. F1.2.1-F1.2.13, 27 abr. 2001.

GONZALES, M; VILLENA, G. K.; KITAZONO, A. A. Evaluation of the antioxidant activities of aqueous extracts from seven wild plants from the Andes using an in vivo yeast assay. **Results in Chemistry**, p. 100098, 2021.

GORDILLO, B.; BACA B. B.; RODRIGUEZ P. F. J.; GONZÁLEZ-MIRET, M. L.; ESTÉVEZ, I. G.; QUIJADA M. N.; ESCRIBANO, B M. T. Optimisation of an oak chips-grape mix maceration process. Influence of chip dose and maceration time. **Food chemistry**, v. 206, p. 249-259, 2016.

GRANATO, D.; NUNES, D. S. Análises químicas, propriedades funcionais e controle da qualidade de alimentos e bebidas: uma abordagem teórico-prática. **Elsevier B** ed. Rio de Janeiro, 2016.

GUO, N., JIANG, YW, WANG, LT, NIU, LJ, LIU, ZM E FU, YJ. Solventes eutéticos profundos naturais combinados com a técnica de extração integrativa como uma abordagem eficaz para a extração de antocianina de amoreira. **Química alimentar**, v. 296, p. 78-85, 2019.

HADIDI, M.; IBARZ, A.; PAGAN, J. Optimisation and kinetic study of the ultrasonic-assisted extraction of total saponins from alfalfa (*Medicago sativa*) and its bioaccessibility using the response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 309, p. 125786, 2020.

HALL, R. M. Recuperação de extratos ricos em compostos bioativos da semente de mamão (*Carica papaya L.*) por extração supercrítica e por líquido pressurizado. **Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)** – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC. 2018.

HAMEED, B. H.; TAN, I. A. W.; AHMAD, A. L. Optimization of basic dye removal by oil palm fibre-based activated carbon using response surface methodology. **Journal of hazardous materials**, v. 158, n. 2-3, p. 324-332, 2008.

HAMMI, K. M.; JDEY, A.; ABDELLY, C.; MAJDOUB, H.; KSOURI, R. Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from Tunisian *Zizyphus lotus* fruits using response surface methodology. **Food chemistry**, v. 184, p. 80-89, 2015.

HANSEN, B. B.; SPITTLE, S.; CHEN, B.; POE D.; ZHANG, Y.; KLEIN, J. M.; HORTON, A.; ADHIKARI L.; ZELOVICH, T.; DOHERTY, B. W.; GURKAN, B.; MAGINN, E. J.; RAGAUSKAS, A.; DADMUN, M.; ZAWODZINSKI, T. A.; BAKER, G. A.; TUCKERMAN, M. E.; SAVINELL, R. F.; SANGORO, J. R. Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. **Revisões Químicas**, 2020.

HAYYAN, A.; MJALLI, F. S.; ALNASHEF, I. M.; AL-WAHAIBI, Y. M.; AL-WAHAIBI, T.; HASHIM, M. A. Glucose-based deep eutectic solvents: Physical properties. **Journal of Molecular Liquids**, v. 178, p. 137-141, 2013.

HELDMAN, D. R. Projeto de processos de preservação de alimentos. **Academic Press**, 2011.

HELENO, S. A.; DIZ, P.; PRIETO, M. A.; BARROS, L.; RODRIGUES, A.; BARREIRO, M. F.; FERREIRA, I. C. Optimization of ultrasound-assisted extraction to obtain mycosterols from

Agaricus bisporus L. by response surface methodology and comparison with conventional Soxhlet extraction. **Food chemistry**, v. 197, p. 1054-1063, 2016.

HERNÁNDEZ, E.; RAVENTÓS, M.; AULEDA, J. M.; IBARZ, A. Freeze concentration of must in a pilot plant falling film cryoconcentrator. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 130-136, 2010.

HERRERO, M.; CASTRO, P. M.; MENDIOLA, J. A.; IBAÑEZ, E. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 67-83, 2013.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*, v. 37, n. 9–10, p. 937–942, 1999.

HUANG, H.; XU, Q.; BELWAL, T.; LI, L.; AALIM, H.; WU, Q.; DUAN, Z.; ZHANG, X.; LUO, Z. Ultrasonic impact on viscosity and extraction efficiency of polyethylene glycol: A greener approach for anthocyanins recovery from purple sweet potato. **Food chemistry**, v. 283, p. 59-67, 2019.

IBERAHIM, N.; SETHUPATHI, S.; GOH, C. L.; BASHIR, M. J.; AHMAD, W. Optimization of activated palm oil sludge biochar preparation for sulphur dioxide adsorption. **Journal of environmental management**, v. 248, p. 109302, 2019.

IBÁÑEZ, F.; TORRE, PALOMA; IRIGOYEN, A. Aditivos alimentarios. Área de Nutrición y Bromatología, **Universidad Pública de Navarra**, 3-5, 2003.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. 1a Edição Digital. Métodos físicos-químicos para análise de Alimentos, 2008.

IVANOVIĆ, M.; ALBREHT, A.; KRAJNC, P.; VOVK, I.; RAZBORŠEK, M. I. Sustainable ultrasound-assisted extraction of valuable phenolics from inflorescences of *Helichrysum arenarium* L. using natural deep eutectic solvents. **Industrial Crops and Products**, p. 113102, 2020.

JASTER, H.; AREND, G. D.; REZZADORI, K.; CHAVES, V. C.; REGINATTO, F. H.; PETRUS, J. C. C. Enhancement of antioxidant activity and physicochemical properties of yogurt enriched with concentrated strawberry pulp obtained by block freeze concentration. **Food Research International**, v. 104, p. 119-125, 2018.

JIA, Z.; DUMONT, M. J.; ORSAT, V. Encapsulation of phenolic compounds present in plants using protein matrices. **Food Bioscience**, v. 15, p. 87-104, 2016.

JIANG, G.; HOU, X.; ZENG, X.; ZHANG, C.; WU, H.; SHEN, G.; LI, S.; LUO, Q.; LI, M.; LIU, X.; CHEN, A.; WANG, Z.; ZHANG, Z. Preparação e caracterização de filmes indicadores de carboximetilcelulose / amido e batata doce roxa (*Ipomoea batatas* (L.) lam) antocianinas para monitoramento do frescor de peixes. **Jornal internacional de macromoléculas biológicas**, v. 143, p. 359-372, 2020.

JOVANOVIĆ, A. A.; ĐORĐEVIĆ, V. B.; ZDUNIĆ, G. M.; PLJEVLJAKUŠIĆ, D. S.; ŠAVIKIN, K. P.; GOĐEVAC, D. M.; BUGARSKI, B. M. Optimization of the extraction process of polyphenols from the herb *Thymus serpyllum* L. using maceration, heat and ultrasound techniques. **Separation and Purification Technology**, v. 179, p. 369-380, 2017.

JU, Z. Y.; HOWARD, L. R. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5207-5213, 2003.

JU, Z.; HOWARD, L. R. Subcritical water and sulfured water extraction of anthocyanins and other phenolics from dried red grape skin. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 4, p. S270-S276, 2005.

JUN, S.; SHIN, S.; JOUNG, H. Estimation of dietary flavonoid intake and major food sources of Korean adults. **British Journal of Nutrition**, v. 115, n. 3, p. 480-489, 2016.

KECHINSKI, C. P.; GUIMARÃES, P. V. R.; NOREÑA, C. P. Z.; TESSARO, I. C.; MARCZAK, L. D. F. Degradation kinetics of anthocyanin in blueberry juice during thermal treatment. **Journal of food science**, v. 75, n. 2, p. C173-C176, 2010.

KHAJEH, M. Response surface modelling of lead pre-concentration from food samples by miniaturised homogenous liquid–liquid solvent extraction: Box–Behnken design. **Food chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1832-1838, 2011.

KHAZAEI, J. Influence of impact velocity and moisture content on mechanical damages of white kidney beans under loadings. **Cercetari agronomice in Moldova (Romania)**, v. 1, n. 137, p. 5-18, 2009.

KONCZAK, I.; ZHANG, W. Anthocyanins—more than nature's colours. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2004, n. 5, p. 239, 2004.

KOU, P.; KANG, Y. F.; WANG, L. T.; NIU, L. J.; XIAO, Y.; GUO, N.; CUIA, Q.; LIA, Y. Y.; FU, Y. J. An integrated strategy for production of four anthocyanin compounds from *Ribes nigrum* L. by deep eutectic solvents and flash chromatography. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 80, p. 614-625, 2019.

KOU, P.; WAN, N.; WANG, L. T.; PAN, H. Y.; JIAO, J.; ZHAO, C. J.; LIU, Z. G.; WANG X. Q.; FU, Y. J. A sustainable and efficient preparation process of anthocyanins from blue honeysuckle fruit and comprehensive bioactivity assessment. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 116, p. 3-10, 2020.

KOWALSKA, G.; WYROSTEK, J.; KOWALSKI, R.; PANKIEWICZ, U. Evaluation of glycerol usage for the extraction of anthocyanins from black chokeberry and elderberry fruits. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, p. 100296, 2021.

KUMORO, A. C.; RETNOWATI, D. S.; BUDIYATI, C. S. Solubility of delphinidin in water and various organic solvents between (298.15 and 343.15) K. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 55, n. 7, p. 2603-2606, 2010.

LAZZAROTTO, S. D. S.; HORNUNG, P.; LAZZAROTTO, M.; WENDLING, I.; SCHNITZLER, E. Incorporação de extrato crioconcentrado de erva-mate em amido de milho. In: **Embrapa Florestas-Artigo em anais de congresso**. In: simpósio de análise térmica, Ponta Grossa, PR. 2017.

LESELLIER, E.; LEFEBVRE, T.; DESTANDAU, E. Recent developments for the analysis and the extraction of bioactive compounds from *Rosmarinus officinalis* and medicinal plants of the Lamiaceae family. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 135, p. 116158, 2020.

LIANFU, Z.; ZELONG, L. Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 15, n. 5, p. 731-737, 2008.

LI, X.; ROW, K. H. Development of deep eutectic solvents applied in extraction and separation. **Journal of separation science**, v. 39, n. 18, p. 3505-3520, 2016.

LIMA, A. A.; SUSSUCHI, E. M.; GIOVANI, W. F. Electrochemical and antioxidant properties of anthocyanins and anthocyanidins. **Croatica chemica acta**, v. 80, n. 1, p. 29-34, 2007.

LING, J. K. U.; SAN C. Y.; NANDONG, J. Degradation kinetics modeling of antioxidant compounds from the wastes of *Mangifera pajang* fruit in aqueous and choline chloride/ascorbic acid natural deep eutectic solvent. **Journal of Food Engineering**, p. 110401, 2020.

LOARCE, L.; SIMANCAS, O. R.; MARCHANTE, L.; MAROTO, D. M. C.; ALAÑÓN, M. E. Implementation of subcritical water extraction with natural deep eutectic solvents for sustainable extraction of phenolic compounds from winemaking by-products. **Food Research International**, v. 137, p. 109728, 2020.

LOPES, T.; XAVIER, M.; QUADRI, M. G.; QUADRI, M. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 13, n. 3, 2007.

LÓPEZ, C. J.; CALEJA, C.; PRIETO, M. A.; SOKOVIC, M.; CALHELHA, R. C.; BARROS, L.; & FERREIRA, I. C. Stability of a cyanidin-3-O-glucoside extract obtained from *Arbutus unedo* L. and incorporation into wafers for colouring purposes. **Food chemistry**, v. 275, p. 426-438, 2019.

LOS, F. G. B.; ZIELINSKI, A. A. F.; WOJEICCHOWSKI, J. P.; NOGUEIRA, A.; DEMIATE, I. M. Extraction optimization of phenolic extracts from carioca bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using response surface methodology. **Food Analytical Methods**, v. 12, n. 1, p. 148-159, 2019.

MACZ, P. G. A., RIVAS, G. J. C.; PÉREZ, A. J. J.; GONZÁLEZ, P. A. M. Natural occurrence of free anthocyanin aglycones in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food chemistry**, v. 94, n. 3, p. 448-456, 2006.

MADRERA, R. R.; NEGRILLO, A. C.; VALLES, B. S.; FERNÁNDEZ, J. J. F. Characterization of extractable phenolic profile of common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.) in a Spanish diversity panel. **Food Research International**, v. 138, p. 109713, 2020.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 59-82, 2006.

MARTINS, F. C.; SENTANIN, M. A.; SOUZA, D. Analytical methods in food additives determination: Compounds with functional applications. **Food chemistry**, v. 272, p. 732-750, 2019.

MARTINS, N.; RORIZ, C. L.; MORALES, P.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. Corantes alimentares: Desafios, oportunidades e anseios atuais das agroindústrias para garantir as expectativas dos consumidores e as práticas regulatórias. **Trends in Food Science & Technology**, v. 52, p. 15 de janeiro de 2016.

MAZZUCO, H. Ovo: alimento funcional, perfeito à saúde. **Revista Avicultura Industrial**, v. 2, p. 12-16, 2008.

MEDINA, D. K.; MORENO, S. Y.; MILENKOVIC, D.; YÁÑEZ, F. L.; MARMOLEJO, M. E.; CIAPARA, H I.; CERVANTES, L E. In silico analysis of antidiabetic potential of phenolic compounds from blue corn (*Zea mays* L.) and black bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Heliyon**, v. 6, n. 3, p. e03632, 2020.

MEHMOOD, A.; ZHAO, L.; WANG, Y.; PAN, F.; HAO, S.; ZHANG, H.; IFTIKHAR, A.; USMAN, M. Antocianinas dietéticas como moduladores naturais potenciais para a prevenção e tratamento da doença hepática gordurosa não alcoólica: uma revisão abrangente. **Food Research International**, p. 110180, 2021.

MERCALI, G. D.; JAESCHKE, D. P.; TESSARO, I. C.; MARCZAK, L. D. F. Degradation kinetics of anthocyanins in acerola pulp: Comparison between ohmic and conventional heat treatment. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 853-857, 2013.

MJALLI, F. S.; MOUSA, H. Viscosity of aqueous ionic liquids analogues as a function of water content and temperature. **Chinese journal of chemical engineering**, v. 25, n. 12, p. 1877-1883, 2017.

MOJICA, L.; BERHOW, M.; MEJIA, E. G. Black bean anthocyanin-rich extracts as food colorants: Physicochemical stability and antidiabetes potential. **Food chemistry**, v. 229, p. 628-639, 2017.

MOJICA, L.; MEYER, A.; BERHOW, M. A.; MEJÍA, E. G. Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) have similar high antioxidant capacity, in vitro inhibition of α -amylase and α -glucosidase while diverse phenolic composition and concentration. **Food Research International**, v. 69, p. 38-48, 2015.

MOLAEAFARD, S.; JAMEI, R.; MARJANI, A. P. Co-pigmentação de antocianinas extraídas da cereja azeda (*Prunus cerasus* L.) com alguns ácidos orgânicos: Intensidade de cor, estabilidade térmica e parâmetros termodinâmicos. **Food Chemistry**, v. 339, p. 128070, 2021.

MORENO, G. M. B.; BUZZULINI, C.; BORBA, H.; COSTA, A. J.; LIMA, T. M. A.; DOURADO, J. F. B. Efeito do genótipo e do teor de proteína da dieta sobre a qualidade da carne de cordeiros. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 3, 2011.

MUFARI, J. R.; RODRÍGUEZ R.; A. C.; BERGESSE, A. E.; MIRANDA V. P. P.; NEPOTE, V.; VELEZ, A. R. Bioactive compounds extraction from malted quinoa using water-ethanol mixtures under subcritical conditions. **LWT**, p. 110574, 2020.

NAZGHELICHI, T.; AGHBASHLO, M.; KIANMEHR, M. H. Optimization of an artificial neural network topology using coupled response surface methodology and genetic algorithm for fluidized bed drying. **Computers and electronics in agriculture**, v. 75, n. 1, p. 84-91, 2011.

NDOMOU, S. C. H; DJIKENG, DJIKENG F. T; TEBOUKEU, G. B; DOUNGUE, H. T; FOFPE, H. A. K; TIWO C. T; WOMENI, H. M. Nutritional value, Phytochemical Content, and Antioxidant Activity of three phytobiotic plants from West Cameroon. **Journal of Agriculture and Food Research**. 2021.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos-: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Bookman Editora, 2010.

NIETO, A.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCÉ, R. M. Pressurized liquid extraction: A useful technique to extract pharmaceuticals and personalcare products from sewage sludge. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 752–764, 2010.

NIKNADDAF, F.; SHAHANGIAN, S. S.; HEYDARI, A.; HOSSEINKHANI, S.; SAJEDI, R. H. Deep Eutectic Solvents as a New Generation of Chemical Chaperones. **ChemistrySelect**, v. 3, n. 38, p. 10603-10607, 2018.

NOVAES, C. G.; YAMAKI, R. T.; PAULA, V. F. NASCIMENTO, J. B. B.; BARRETO, J. A.; VALASQUES, G. S.; BEZERRA, M. A. Otimização de métodos analíticos usando metodologia de superfícies de resposta-Parte I: variáveis de processo. **Revista Virtual Quimica**, v. 9, n. 3, p. 1284-1215, 2017.

OLIVEIRA, E. N. A.; COSTA, S. D.; SILVA, O. A.; SOUSA, F. C. Composição físico-química de leites em diferentes fases de lactação. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 8, n. 4, p. 409-415, 2010.

OLIVEIRA, L. M; ANTELO, F. Thermostability of the visual color and anthocyanins from Rio-Grande-Cherry (*Eugenia involucrata* DC). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 23, 2020.

ONOJI, S. E.; IYUKE, S. E.; IGBAFE, A. I.; DARAMOLA, M. O. Hevea brasiliensis (rubber seed) oil: modeling and optimization of extraction process parameters using response surface methodology and artificial neural network techniques. **Biofuels**, v. 10, n. 6, p. 677-691, 2019.

ONSEKIZOGLU, P.; BAHCECI, K. S.; ACAR, M. J. Esclarecimento e concentração de suco de maçã usando processos de membrana: **Uma avaliação comparativa da qualidade. Journal of Membrane Science**, v. 352, n. 1-2, pág. 160-165, 2010.

PACE, C.; GIACOSA, S.; TORCHIO, F.; SEGADE, S. R.; CAGNASSO, E.; ROLLE, L. Extraction kinetics of anthocyanins from skin to pulp during carbonic maceration of winegrape berries with different ripeness levels. **Food chemistry**, v. 165, p. 77-84, 2014.

PALMA, P.; PETZOLD, G.; PIERRE, L.; PENSABEN, J. M. Protection of polyphenols in blueberry juice by vacuum-assisted block freeze concentration. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 1093-1102, 2017.

PANIĆ, M.; GUNJEVIĆ, V.; CRAVOTTO, G.; REDOVNIKOVIĆ, I. R. Enabling technologies for the extraction of grape-pomace anthocyanins using natural deep eutectic solvents in up-to-half-litre batches extraction of grape-pomace anthocyanins using NADES. **Food chemistry**, v. 300, p. 125185, 2019.

PARR, A. J.; BOLWELL, G. P. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 985-1012, 2000.

PATEL, K.; JAIN, A.; PATEL, D. K. Medicinal significance, pharmacological activities, and analytical aspects of anthocyanidins 'delphinidin': A concise report. **Journal of Acute Disease**, v. 2, n. 3, p. 169-178, 2013.

PATRAS, A.; BRUNTON, N. P.; O'DONNELL, C.; TIWARI, B. K. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 1, p. 3-11, 2010.

PEDRO, A. C.; GRANATO, D.; ROSSO, N. D. Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability. **Food Chemistry**, v. 191, p. 12-20, 2016.

PERERA, C. O.; ALZHRANI, M. A. J. Ultrasound as a pre-treatment for extraction of bioactive compounds and food safety: A review. **LWT**, v. 142, p. 111114, 2021.

PERON, D. V.; FRAGA, S.; ANTELO, F. Thermal degradation kinetics of anthocyanins extracted from juçara (*Euterpe edulis* Martius) and “Italia” grapes (*Vitis vinifera* L.), and the effect of heating on the antioxidant capacity. **Food chemistry**, v. 232, p. 836-840, 2017.

PETERSSON, E. V.; LIU, J.; SJÖBERG, P. J.; DANIELSSON, R.; TURNER, C. Pressurized hot water extraction of anthocyanins from red onion: A study on extraction and degradation rates. **Analytica chimica acta**, v. 663, n. 1, p. 27-32, 2010.

PETZOLD, G.; AGUILERA, J. M. Centrifugal freeze concentration. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 20, p. 253-258, 2013.

PETZOLD, G.; MORENO, J.; LASTRA, P.; ROJAS, K.; ORELLANA, P. Block freeze concentration assisted by centrifugation applied to blueberry and pineapple juices. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 30, p. 192-197, 2015.

PETZOLD, G.; ORELLANA, P.; MORENO, J.; CERDA, E.; PARRA, P. Vacuum-assisted block freeze concentration applied to wine. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 36, p. 330-335, 2016.

PIÑEIRO, Z.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids. **Journal of Chromatography A**, v. 1026, n. 1-2, p. 19-23, 2004.

PINELA, J.; PRIETO, M. A.; PEREIRA, E.; JABEUR, I.; BARREIRO, M. F.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. Optimization of heat-and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* calyces for natural food colorants. **Food chemistry**, v. 275, p. 309-321, 2019.

PINTO, D.; VIEIRA, E. F.; PEIXOTO, A. F.; FREIRE, C.; FREITAS, V.; COSTA, P.; RODRIGUES, F. Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from chestnut shells by subcritical water extraction using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 334, p. 127521, 2021.

PINTO, J. S. S.; LANÇAS, F. M. Hidrólise do óleo de Azadirachta indica em água subcrítica e determinação da composição dos triacilglicerídeos e ácidos graxos por cromatografia gasosa de alta resolução a alta temperatura e cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 394-397, 2010.

PLAZA, M.; TURNER, C. Pressurized hot water extraction of bioactives. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 39-54, 2015.

POJER, E.; MATTIVI, F.; JOHNSON, D.; STOCKLEY, C. S. The case for anthocyanin consumption to promote human health: a review. **Comprehensive Review in Food Science and Food Safety**, v. 12, p. 483-508, 2013.

RADOŠEVIĆ, K.; ČURKO, N.; SRČEK, V. G.; BUBALO, M. C.; TOMAŠEVIĆ, M.; GANIĆ, K. K.; REDOVNIKOVIĆ, I. R. Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. **LWT**, v. 73, p. 45-51, 2016.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE E. C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RENARD, C. M. Extraction of bioactives from fruit and vegetables: State of the art and perspectives. **Lwt**, v. 93, p. 390-395, 2018.

REYNERTSON, K. A.; WALLACE, A. M.; ADACHI, S.; GIL, R. R.; YANG, H.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Bioactive Depsides and Anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 8, p. 1228-1230, 2006.

ROCHA-GUZMÁN, N. E. et al. Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 521–527, 2007.

ROY, VC, HO, TC, LEE, HJ, PARK, JS, NAM, SY, LEE, H., CHUN, BS. Extração de astaxantina usando solventes eutéticos profundos naturais assistidos por ultrassom de resíduos de camarão e sua aplicação em filmes bioativos. **Journal of Cleaner Production**, v. 284, p. 125417, 2020.

RUDKE, A. R.; MAZZUTTI, S.; ANDRADE, K. S.; VITALI, L.; FERREIRA, S. R. S. Optimization of green PLE method applied for the recovery of antioxidant compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L.) shell. **Food Chemistry**, v. 298, n. March, p. 125061, 2019.

SÁNCHEZ, J.; RUIZ, Y.; RAVENTÓS, M.; AULEDA, J. M.; HERNÁNDEZ, E. Progressive freeze concentration of orange juice in a pilot plant falling film. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 4, p. 644-651, 2010.

SAFIEI, N. Z.; ALAUDIN, B. J. S. Optimization of *Labisia pumila* extract concentration via block freeze concentration assisted with centrifugation method. **Materials Today: Proceedings**, 2020.

SETFORD, P. C.; JEFFERY, D. W.; GRBIN, P. R.; MUHLACK, R. A. Factors affecting extraction and evolution of phenolic compounds during red wine maceration and the role of process modelling. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 106-117, 2017.

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

SILVA, A. M.; FERREIRA, N. L.; OLIVEIRA, A. E.; BORGES, L. L.; CONCEIÇÃO, E. C. Comparação da extração assistida por ultrassom e maceração dinâmica sobre o conteúdo de tagitinina C obtida de folhas de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. cinza usando planejamento fatorial. **Revista Pharmacognosy**, v. 13, n. 50, pág. 270, 2017.

SILVA, D. T.; PAULETTO, R.; CAVALHEIRO, S. S.; BOCHI, V. C.; RODRIGUES, E.; WEBER, J.; SILVA, C. B.; MORISSO, F. D. P.; BARCIA, M. T.; EMANUELLI, T. Natural deep eutectic solvents as a biocompatible tool for the extraction of blueberry anthocyanins. **Journal of food composition and analysis**, v. 89, p. 103470, 2020.

SILVA, D. T.; RODRIGUES, R. F.; MACHADO, N. M.; MAURER, L. H.; FERREIRA, L. F.; SOMACAL, S.; EMANUELLI, T. Natural deep eutectic solvent (NADES)-based blueberry extracts protect against ethanol-induced gastric ulcer in rats. **Food Research International**, v. 138, p. 109718, 2020.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolic with phosphomolibdic acid reagent. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144– 158, 1965.

SMITH, E. L.; ABBOTT, A. P.; RYDER, K. S. Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. **Chemical reviews**, v. 114, n. 21, p. 11060-11082, 2014.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P.; RODRIGUES, C.; PANDEY, A. Novas perspectivas para produção e aplicação de ácido cítrico. **Food Technology & Biotechnology**, v. 44, n. 2, 2006.

SORIA, A C.; VILLAMIEL, M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. **Trends in food science & technology**, 21.7: 323-331. 2010.

SOUZA, S. J. A.; SCALISE, C.; BAPTISTA, A. S.; LIMA, R. B.; AGUIAR, C. L. Parâmetros de influência na extração de compostos fenólicos de partes aéreas da cana-de-açúcar com atividade antioxidante total. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, 2013.

TAKEOKA, G. R.; DAO, L. T.; FULL, G. H.; WONG, R. Y.; HARDEN, L. A.; EDWARDS, R. H.; BERRIOS, J. D. J. Characterization of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 3395-3400, 1997.

TEIXEIRA, R. F.; BENVENUTTI, L.; BURIN, V. M.; GOMES, T. M.; FERREIRA, S. R. S.; ZIELINSKI, A. A. F. An eco-friendly pressure liquid extraction method to recover

anthocyanins from broken black bean hulls. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 67, p. 102587, 2021.

TEO, C. C.; TAN, S. N.; YONG, J. W. H.; HEW, C. S.; ONG, E. S. Extração de água quente pressurizada (PHWE). **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, pág. 2484-2494, 2010.

TÜRKER, A. D.; DOĞAN, M. Application of deep eutectic solvents as a green and biodegradable media for extraction of anthocyanin from black carrots. **LWT**, p. 110775, 2020.

WANG, Y.; LIU, Y.; HU, Y. Otimização da extração de polissacarídeos de *Trametes robiniophila* e suas atividades antioxidantes. **Polímeros de carboidratos**, v. 111, p. 324-332, 2014.

WANG, Y.; LUAN, G.; ZHOU, W.; MENG, J.; WANG, H.; HU, N.; SUO, Y. Subcritical water extraction, UPLC-Triple-TOF/MS analysis and antioxidant activity of anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr. **Food chemistry**, v. 249, p. 119-126, 2018.

WIECHETECK, F. V. B., NOGUEIRA, A., DRILLEAU, J. F., & WOSIACKI, G. Efeito da crioconcentração sobre o teor de compostos fenólicos em mostos industriais de maçãs. 2005.

WU, X.; PRIOR, R. L. Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography– electrospray ionization– tandem mass spectrometry in common foods in the United States: Vegetables, nuts, and grains. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 8, p. 3101-3113, 2005.

YUAN, B.; LU, M.; ESKRIDGE, K. M.; ISOM, L. D.; HANNA, M. A. Extraction, identification, and quantification of antioxidant phenolics from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shells. **Food chemistry**, v. 244, p. 7-15, 2018.

YUAN, Y.; ZHANG, Y.; LIU, T.; HU, P.; ZHENG, Q. Optimization of microwave roasting-acid leaching process for vanadium extraction from shale via response surface methodology. **Journal of Cleaner Production**, v. 234, p. 494-502, 2019.

ZHANG, J.; WEN, C.; ZHANG, H.; DUAN, Y.; MA, H. Recent advances in the extraction of bioactive compounds with subcritical water: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 95, p. 183-195, 2020.

ZHANG, Z. S.; WANG, L. J.; LI, D.; JIAO, S. S.; CHEN, X. D.; MAO, Z. H. Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed. **Separation and Purification Technology**, v. 62, n. 1, p. 192-198, 2008.

ZHENG, Z.; LI, J.; LI, J.; SUN, H.; LIU, Y. Physicochemical and antioxidative characteristics of black bean protein hydrolysates obtained from different enzymes. **Food Hydrocolloids**, v. 97, p. 105222, 2019.

ZHU, F. Anthocyanins in cereals: Composition and health effects. **Food Research International**, v. 109, p. 232-249, 2018.