



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

Bruno Luís Ferreira

**Extração de compostos bioativos do resíduo do processamento da goiaba (*Psidium guajava*) utilizando líquidos iônicos**

Florianópolis  
2022

Bruno Luís Ferreira

**Extração de compostos bioativos do resíduo do processamento da goiaba (*Psidium guajava*) utilizando líquidos iônicos**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.  
Orientador: Prof. Dra. Itaciara L Nunes  
Coorientador: Prof. Dr. Daniel Granato (University of Limerick – Ireland)

Florianópolis  
2022

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

Ferreira, Bruno Luís

Extração de compostos bioativos do resíduo do processamento da goiaba (*Psidium guajava*) utilizando líquidos iônicos / Bruno Luís Ferreira ; orientadora, Itaciara Larroza Nunes, coorientador, Daniel Granato, 2022. 134 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. I. Nunes, Itaciara Larroza. II. Granato, Daniel. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. IV. Título.

Bruno Luís Ferreira

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO RESÍDUO DO  
PROCESSAMENTO DA GOIABA (*Psidium guajava*) UTILIZANDO LÍQUIDOS IÔNICOS

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

Prof.(a) Paula Larangeira Garcia Martins, Dr.(a)  
Instituto Federal de São Paulo (IFSP) – Campus Registro

Prof.(a) Tatiane de Andrade Maranhão, Dr.(a)  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof.(a) Carlise Beddin Fritzen Freire, Dr.(a)  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi  
julgado adequado para obtenção do título de doutor em Ciência dos Alimentos.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof.(a) Itaciara Larroza Nunes, Dr.(a)  
Orientador(a)

Florianópolis, 2022

Dedicado, com amor, aos meus pais Selma e Nilton

## AGRADECIMENTOS

- Agradecimento aos meus pais pela vida e pelo amor;
- Agradeço em particular a algumas pessoas especiais que sempre me apoiaram e me ajudaram a chegar até esse momento marcante da minha vida: Wagner, Gerson, Laércio, Carol, Rose, Renata, Márcia, Prof Eduardo e Prof Ewersom (*in memoriam*).
- Agradecimento especial aos colegas do Laboratório de Óleos e Gorduras (LOG) da UFSC;
- Agradecimento especial aos queridos colegas do Laboratório de Química de Alimentos da UFSC;
- Agradecimento aos colegas do Laboratório de Fitopatologia da UFSC;
- Agradecimento a UFSC por me proporcionar experiências profissionais e pessoais incríveis;
- Agradecimento a professora Jane Block, supervisora do LOG;
- Agradecimento ao professor Marciel Stadinik, por autorizar a utilização do leitor de microplacas;
- Agradecimento a minha orientadora, professora Itaciara, e meu orientador, professor Daniel;
- Agradecimento a CAPES e FAPESC pela bolsa concedida.

Teoria é quando você sabe tudo, mas nada funciona. Prática é quando tudo funciona, mas ninguém sabe o porquê. Em nosso laboratório, a prática e a teoria são combinadas: nada funciona e ninguém sabe o porquê!

Autor desconhecido.

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo elaborar uma revisão bibliográfica, uma prospecção científica e tecnológica a respeito dos LIs para extração de bioativos, além de otimizar os parâmetros de extração e obter compostos fenólicos do resíduo do processamento da goiaba utilizando extração com LI assistida por ultrassom (ELIAU) e comparando o extrato otimizado a solventes tradicionais na recuperação desses compostos. A etapa 1 consistiu na revisão bibliográfica sobre a goiaba e o resíduo do processamento, e os principais eventos históricos, características, vantagens, desvantagens e efeitos adversos do uso de LIs na Ciência de Alimentos. Na etapa 2, foi realizada uma prospecção científica e tecnológica avaliando o uso dos LIs para extração. Observou-se um crescimento das pesquisas com LIs, porém, os resultados sugerem reduzida transferência de tecnologia e proteção das pesquisas desenvolvidas. Nas etapas experimentais foram utilizadas amostras de goiaba comerciais e obtido o resíduo (casca, semente e sobras de polpa). Na etapa 3, foi utilizado um delineamento  $2^3$  para avaliar a influência da concentração do LI (0,4; 1,45 e 2,5 mol L<sup>-1</sup> de cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][Cl]), tempo de extração (10, 25 e 40 min) e temperatura (35, 45 e 55 °C) na extração de fenólicos totais e no potencial antioxidante dos extratos. O LI em 2,5 mol L<sup>-1</sup> foi eficiente na recuperação dos fenólicos totais (4,01 mg g<sup>-1</sup> ácido gálico) e maior atividade antioxidante (8,77 mg g<sup>-1</sup> ác. ascórbico), com resultados superiores ao controle utilizando metanol (1,58 mg g<sup>-1</sup> ác. gálico e 3,65 mg g<sup>-1</sup> ác. ascórbico). Na etapa 4, foi realizado um planejamento  $2^4$  (variando tipo de LI - [BMIM][Cl] e tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][BF<sub>4</sub>], razão amostra/solvente, tempo de ultrassom e temperatura) avaliando-se os fatores significantes na extração dos compostos fenólicos com atividade antioxidante do resíduo do processamento da goiaba com ELIAU. Os fatores significantes “tipo de LI” e “razão amostra/solvente” foram otimizados utilizando um delineamento composto central rotacional  $2^2$ , e função desejabilidade, em função das mesmas respostas. A condição otimizada: razão amostra/solvente de 20 g L<sup>-1</sup> de resíduo de goiaba, 25 min de extração por ultrassom, a 45 °C, usando 100% de uma solução aquosa de 2,5 mol L<sup>-1</sup> de [BMIM][BF<sub>4</sub>] (definida na etapa 3), foi comparada em relação aos fenólicos totais, flavonóis totais, taninos condensados e *orto*-difenois; e atividade antioxidante (DPPH, FRAP, ABTS, inibição da peroxidação lipídica, poder quelante de Fe<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup>) com extratos obtidos com etanol 100, 80 e 50%, metanol 100, 80 e 50%, água e água acidificada (1% de ác. acético). A extração ELIAU recuperou principalmente taninos condensados (6,44 mg g<sup>-1</sup> catequina), e compostos *orto*-difenólicos (1,76 mg g<sup>-1</sup> ac. cafeico). Também foi eficaz na extração de compostos

antioxidantes, considerando as respostas de DPPH (14,28 mg g<sup>-1</sup> ác. ascórbico), FRAP (20,71 mg g<sup>-1</sup> ac. ascórbico), ABTS (43,60 mg g<sup>-1</sup> Trolox), e potencial de quelar íons Cu<sup>2+</sup>. O uso de LIs mostrou-se uma alternativa rápida, robusta e inovadora em substituição aos solventes orgânicos para obtenção de compostos fenólicos com ação antioxidante do resíduo do processamento da goiaba, agregando valor a esse subproduto industrial.

**Palavras-chave:** Cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio; Tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio; Solventes orgânicos; Coproduto do processamento da goiaba; Atividade antioxidante; Compostos fenólicos.

## ABSTRACT

The present work aimed to elaborate a bibliographic review, a scientific and technological prospection regarding ILs for the extraction of bioactive, in addition to optimizing the extraction parameters and obtaining phenolic compounds from the guava processing residue using ultrasound-assisted IL extraction (ELIAU) and comparing the optimized extract to the traditional solvents in the recovery of these compounds. Step 1 consisted of a literature review on guava and its processing residue and the main historical events, characteristics, advantages, disadvantages, and adverse effects of using ILs in Food Science. In step 2, a scientific and technological prospection was carried out to evaluate the use of ILs for extraction. An increase in research with ILs was observed; however, the results suggest the reduced technology transference and protection of the research developed with IL. Commercial guava samples were used in the experimental stages, and the residue (peel, seed, and pulp leftovers) was obtained. In step 3, a design  $2^3$  was used to evaluate the influence of IL concentration (0.4, 1.45, and 2.5 mol L<sup>-1</sup> of 1-butyl-3-methylimidazolium chloride [BMIM][Cl]), extraction time (10, 25 and 40 min) and temperature (35, 45 and 55 °C) on the extraction of total phenolics and antioxidant potential of the extracts. The IL in 2.5 mol L<sup>-1</sup> was efficient in the recovery of total phenolics (4.01 mg g<sup>-1</sup> gallic acid) and higher antioxidant activity (8.77 mg g<sup>-1</sup> ascorbic acid), with better results than the control using methanol (1.58 mg g<sup>-1</sup> gallic acid and 3.65 mg g<sup>-1</sup> ascorbic acid). In step 4, a  $2^4$  design was carried out (varying type of IL - [BMIM][Cl] and 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate [BMIM][BF<sub>4</sub>], sample/solvent ratio, ultrasound time, and temperature) evaluating the significant factors in the extraction of phenolic compounds with antioxidant activity from guava processing residue with ELIAU. The significative factors “IL type” and “sample/solvent ratio” were optimized using a  $2^2$  central rotational composite design, and desirability function, evaluating the same responses. The optimized condition: sample/solvent ratio of 20 g L<sup>-1</sup> of guava residue, 25 min ultrasonic extraction at 45 °C, using 100% of a 2.5 mol L<sup>-1</sup> aqueous solution of [BMIM] [BF<sub>4</sub>] (defined in step 3), was compared for total phenolics, total flavonols, condensed tannins and ortho-diphenols; and antioxidant activity (DPPH, FRAP, ABTS, inhibition of lipid peroxidation, chelating power of Fe<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup>) with extracts obtained with 100, 80 and 50% ethanol, 100, 80 and 50% methanol, water and acidified water (1% of acetic acid). The ELIAU extraction recovered mainly condensed tannins (6.44 mg g<sup>-1</sup> catechin), and *ortho*-diphenolic compounds (1.76 mg g<sup>-1</sup> caffeic ac.). It was also effective in the extraction of antioxidant compounds, considering the responses of DPPH (14.28 mg g<sup>-1</sup> ascorbic acid), FRAP (20.71 mg g<sup>-1</sup> ascorbic acid), ABTS (43.60 mg g<sup>-1</sup>

Trolox), and potential to chelate  $\text{Cu}^{2+}$  ions. The use of ILs proved to be a fast, robust, and innovative alternative to replace organic solvents to obtain phenolic compounds with antioxidant action from the guava processing residue, adding value to this industrial by-product.

**Keywords:** 1-Butyl-3-methylimidazolium chloride; 1-Butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate; Organic solvents; Coproduct of guava processing; Antioxidant activity; Phenolic compounds.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Divisão e etapas do trabalho .....	17
Figura 2 - Classes dos compostos fenólicos e exemplos .....	24
Figura 3 - Linha do tempo dos eventos significantes na história do desenvolvimento dos LIs	30
Figura 4 - Documentos relacionando o termo "ionic liquid", no título, resumo e palavras-chave em diversos manuscritos.....	31
Figura 5 - Top dez áreas com maior número de documentos relacionados ao termo "ionic liquid" em títulos, resumos e palavras-chaves.....	32
Figura 6 – Cátions (A) e ânions (B) comumente utilizados para a síntese de LI .....	34
Figura 7 - Esquema de adição dos ânions para preparação dos LIs baseados em imidazólio..	35
Figura 8 - Passos sugeridos para a investigação toxicológica de extratos obtidos com LIs. Testes <i>in vitro</i> (A), testes <i>in vitro</i> baseados em linhagens celulares e órgãos (B) e testes <i>in vivo</i> (C).	39
Figura 9 - Esquema de extração de compostos bioativos usando LIs assistido por ultrassom ou micro-ondas. ....	45
Figura 10 - Principais LIs utilizados para a extração de compostos bioativos reportados na Tabela 5. [C <sub>6</sub> MIM][Br] (A); [BMIM][Br] ou [C <sub>4</sub> MIM][Br] (B); [BMIM][BF <sub>4</sub> ] ou [C <sub>4</sub> MIM][BF <sub>4</sub> ] (C); [BMIM][Cl] (D); [C <sub>12</sub> MIM][Br] (E).....	55
Figura 11 – Evolução do número de trabalhos recuperados nas bases de dados científicas contendo os descritores utilizados. ....	69
Figura 12 - Distribuição do número de trabalhos envolvendo líquidos iônicos por país. ....	70
Figura 13 - Esquema de pesquisa e número de patentes na base de dados do INPI.....	71
Figura 14 - Dados sobre as patentes internacionais – <i>ESPACENET</i> . ....	74
Figura 15 - Espectro de massas (MS/MS) do LI [BMIM][Cl] sintetizado.....	77
Figura 16 - Gráfico de Pareto dos parâmetros para a composição fenólica total (A); Gráfico “Cube Plot” das respostas previstas para a composição fenólica total (B); Gráfico Pareto dos parâmetros para a atividade antioxidante (C); Gráfico “Cube Plot” das respostas previstas para a atividade antioxidante (D). ....	80
Figura 17 - Superfície de resposta para a composição fenólica total (A) e atividade antioxidante (B).....	82
Figura 18 - Gráficos de Pareto dos parâmetros analisados para as respostas de fenólicos totais e atividade antioxidante do planejamento fatorial completo 2 <sup>4</sup> .....	87
Figura 19 - Superfícies de resposta do planejamento fatorial completo 2 <sup>4</sup> , destacando os parâmetros LI e razão amostra/solvente. ....	89

Figura 20 – Superfícies de contorno do planejamento DCCR 2 <sup>2</sup> para a composição fenólica total e atividade antioxidante. ....	92
Figura 21 - Superfície de resposta da função desejabilidade para composição fenólica total ( <i>Prussian Blue</i> ) e potencial antioxidante (FRAP e DPPH). ....	93
Figura 22 - Gráficos da função desejabilidade indicando o ponto ótimo dos parâmetros LI e razão amostra/solvente. ....	94

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição majoritária da goiaba <i>in natura</i> e do resíduo de seu processamento..	21
Tabela 2 - Diferentes ânions e sua influência no ponto de fusão de LIs baseados em sais de imidazólio. ....	36
Tabela 3 - Trabalhos investigando a citotoxicidade de LIs em modelos celulares e animais. .	40
Tabela 4 - Estudos sobre a extração de compostos bioativos utilizando LIs. ....	51
Tabela 5 - Códigos IPC utilizados na busca de patentes .....	57
Tabela 6 - Número de trabalhos recuperados nas bases de dados científicas contendo os descritores utilizados. ....	67
Tabela 7 - Número de trabalhos encontrados na base de dados <i>ESPACENET</i> . ....	72
Tabela 8 - Matriz do planejamento fatorial completo $2^4$ e resultados das análises do teor de compostos fenólicos totais e potencial antioxidante dos extratos do resíduo do processamento da goiaba.....	78
Tabela 9 - Coeficientes de regressão (efeitos estimados) significativos, coeficientes $R^2$ e $R^2_{ajustado}$ , e falta de ajuste do planejamento fatorial completo $2^3$ para composição fenólica total e atividade antioxidante. ....	80
Tabela 10 - Parâmetros reais e codificados do planejamento fatorial completo $2^4$ com as respostas de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante .....	86
Tabela 11 - Parâmetros reais e codificados do planejamento DCCR $2^2$ para a extração de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante.....	90
Tabela 12 – Coeficientes de regressão (efeitos estimados), coeficientes $R^2$ e $R^2_{ajustado}$ , e falta de ajuste do planejamento DCCR $2^2$ para composição fenólica total e atividade antioxidante. ...	91
Tabela 13 – Índice de desejabilidade, valores preditos da função desejabilidade e valores experimentais para as respostas avaliadas. ....	94
Tabela 14 - Compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante do extrato do resíduo do processamento da goiaba obtidos por ELIAU e outros solventes. ....	97

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[BF<sub>4</sub>] - Tetrafluoroborato

[BMPY] - 1-butil-1-metilpirrolidínio

[DCA] - Dicianamida

[MTT] - Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio

[PF<sub>6</sub>] - Hexafluorofosfato

[TBA] - Tributimetilamônio

[TFSI] – Bis (trifluorometanossulfonil) imida

[Zn] – Zinco

ABTS – *2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)*

BMIM – 1-butil-3-metilimidazólio

DCCR – Delineamento composto central rotacional

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH – 2,2- difenil-1-picril-hidrazil

ELIAU – Extração por líquidos iônicos assistida por ultrassom

EMIM – 1-ethyl-3-butylimidazólio

Eq. – Equivalente

FRAP – *Ferric reducing antioxidant power*

INPI – Instituto Nacional de Propriedade Intelectual

IPC – Do inglês, classificação internacional de patentes

LI – Líquido Iônico

LIs – Líquidos Iônicos

MAE – *Microwave assisted extraction* (extração assistida por micro-ondas)

MS – Espectrometria de massas

PBS - *Phosphate buffered saline*

UAE – *Ultrasound assisted extraction* (extração assistida por ultrassom)

VOS – Do inglês, *volatile organic solvents*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1	Objetivo geral .....	15
2.2	Objetivos específicos .....	15
<b>3</b>	<b>ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO</b> .....	<b>16</b>
<b>4</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA – ETAPA 1</b> .....	<b>17</b>
4.1	GOIABA ( <i>Psidium guajava</i> ), ASPECTOS NATURAIS, BIOLÓGICOS E MERCADOLÓGICOS .....	17
4.2	COMPOSTOS ANTIOXIDANTES .....	23
<b>4.2.1</b>	<b>Determinação da atividade antioxidante</b> .....	<b>25</b>
4.3	SOLVENTES PARA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES .....	27
<b>4.3.1</b>	<b>Uso de solventes orgânicos clássicos no preparo de amostras</b> .....	<b>27</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Líquidos iônicos: histórico, aspectos gerais, químicos e físicos</b> .....	<b>29</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Síntese de líquidos iônicos</b> .....	<b>35</b>
<b>4.3.4</b>	<b>Líquidos iônicos como solventes: legislações, obstáculos, limitações, efeito adversos e toxicidade</b> .....	<b>36</b>
<b>4.3.5</b>	<b>Aplicação de LIs como solvente alternativo para a extração de composto bioativos</b> .....	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS – ETAPAS 2, 3 E 4</b> .....	<b>56</b>
5.1	PROSPECÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA – etapa 2 .....	56
5.2	Experimentos laboratoriais .....	57
<b>5.2.1</b>	<b>Etapa 3</b> .....	<b>57</b>
5.2.1.1	<i>Amostras</i> .....	57
5.2.1.2	<i>Síntese do líquido iônico [BMIM][Cl]</i> .....	58
5.2.1.2.1	Caracterização química do líquido iônico sintetizado .....	59
5.2.1.3	<i>Extração de compostos fenólicos do resíduo do processamento da goiaba usando LI [BMIM][Cl] assistido por ultrassom</i> .....	59
5.2.1.3.1	Delineamento experimental .....	59
5.2.1.3.2	Extração dos compostos fenólicos do resíduo da goiaba com ELIAU e VOS .....	60
5.2.1.4	<i>Análises fitoquímicas in vitro</i> .....	60
5.2.1.4.1	Fenólicos totais .....	60
5.2.1.5	<i>Avaliação do potencial antioxidante in vitro</i> .....	61

5.2.1.5.1	Potencial antioxidante baseado na captura do radical DPPH.....	61
5.2.1.6	<i>Análise estatística</i> .....	61
<b>5.2.2</b>	<b>Etapa 4</b> .....	<b>61</b>
5.2.2.1	<i>Amostras</i> .....	61
5.2.2.2	<i>Síntese do líquido iônico [BMIM][Cl]</i> .....	62
5.2.2.2.1	Caracterização química do líquido iônico sintetizado.....	62
5.2.2.3	<i>Extração com LI assistida por ultrassom (ELIAU) para obtenção do extrato bioativo otimizado do resíduo do processamento da goiaba</i> .....	62
5.2.2.3.1	Delineamento experimental.....	62
5.2.2.3.2	Extração dos compostos fenólicos do resíduo da goiaba com ELIAU e VOS.....	62
5.2.2.4	<i>Análises fitoquímicas in vitro</i> .....	63
5.2.2.4.1	Fenólicos totais.....	63
5.2.2.4.2	Flavonóis totais.....	63
5.2.2.4.3	Taninos condensados.....	63
5.2.2.4.4	Orto-difenóis.....	64
5.2.2.5	<i>Avaliação do potencial antioxidante in vitro</i> .....	64
5.2.2.5.1	Potencial antioxidante baseado na captura do radical DPPH.....	64
5.2.2.5.2	Atividade antioxidante baseada na redução do ferro (Ferric-reducing antioxidant power - FRAP).....	64
5.2.2.5.3	Potencial antioxidante baseada no sequestro do radical ABTS.....	65
5.2.2.5.4	Poder quelante frente aos íons Fe <sup>2+</sup> e Cu <sup>2+</sup> .....	65
5.2.2.6	<i>Inibição biológica in vitro da peroxidação lipídica em gema de ovo</i> .....	66
5.2.2.7	<i>Análise estatística</i> .....	66
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>67</b>
6.1	Etapa 2.....	67
6.1.1	<b>Prospecção Científica</b> .....	<b>67</b>
6.1.2	<b>Prospecção Tecnológica</b> .....	<b>70</b>
6.2	Etapa 3.....	75
6.2.1	<b>Síntese do LI [BMIM][Cl]</b> .....	<b>75</b>
6.2.2	<b>Extração de compostos fenólicos do resíduo do processamento da goiaba usando LI [BMIM][Cl] assistido por ultrassom</b> .....	<b>78</b>
6.3	ETAPA 4.....	84

<b>6.3.1 EXTRAÇÃO COM LÍQUIDOS IÔNICOS ASSISTIDA POR ULTRASSOM (ELIAU) - PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO DE TRIAGEM PARA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....</b>	<b>84</b>
<b>6.3.2 Otimização ELIAU por metodologia de superfície de resposta .....</b>	<b>90</b>
<b>6.3.3 ELIAU e extração com VOS para obtenção de compostos fenólicos com atividade antioxidante.....</b>	<b>95</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>101</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>103</b>
ANEXO A – Primeira página do artigo referente a etapa 1 publicado na revista <i>Critical Reviews in Food Science and Nutrition</i> .....	119
ANEXO B - Primeira página do livro e do capítulo do livro publicado na etapa 2, respectivamente. ....	120
ANEXO C - Primeira página do artigo referente a etapa 4 publicado na revista <i>Biocatalysis and Agricultural Biotechnology</i> . ....	121

## 1 INTRODUÇÃO

A goiaba (*Psidium guajava*) é uma fruta nativa da América do Sul, sendo caracterizada principalmente pelo seu aroma característico, que apresenta em sua composição química importantes compostos bioativos da classe dos fenólicos, como taninos e flavonoides (KORIEEM; ARBID; SALEH, 2019; MACHADO *et al.*, 2018; SOUZA, T. S. *et al.*, 2018). Considerando fruto, folhas e sementes, estudos já foram conduzidos no sentido de investigar as propriedades como atividade anti-inflamatória, antioxidante (FLORES *et al.*, 2013), efeito analgésico (OJEWOLE, 2006), atividade antimicrobiana e hepato protetiva, entre outras (SANDA *et al.*, 2011). Essas características fazem com que a fruta em si seja chamada de “superfruta”, pois apresenta propriedades benéficas ao organismo humano e também uma alta concentração de vitaminas, minerais e compostos fenólicos (ALMULAIKY *et al.*, 2018; FLORES *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2019; NETO, 2007)

De uma maneira geral a goiaba, que apresenta período de safra entre os meses de janeiro a abril, é muito apreciada para consumo *in natura*, porém, o processamento dessa fruta representa cerca de 53 % de toda a produção, dando origem a produtos como bebidas, sorvetes, geleias e compotas (DEL'ARCO; SYLOS, 2018; MCCOOK-RUSSELL *et al.*, 2012; MOON *et al.*, 2018).

O processamento da goiaba acarreta a geração de um resíduo, composto por cascas, sementes e sobras de polpa, que representam cerca de 30 % de todo o volume processado. Esse resíduo é atrativo, principalmente em função da composição rica em compostos bioativos, e vem sendo estudado para diversas aplicações, como por exemplo, na fertilização de solos (MANTOVANI *et al.*, 2004; SEBEN JUNIOR *et al.*, 2011; SOUZA, H. A. De; NATALE; ROZANE, 2011), produção de biscoitos (ABUD; NARAIN, 2010; BERTAGNOLLI *et al.*, 2014), para a extração de compostos fenólicos (LIMA, R. da S. *et al.*, 2019), na incorporação em filtros solares (MILANI *et al.*, 2018), dentre outras, sendo um subproduto com grande valor agregado (HASSAN *et al.*, 2016).

O resíduo do processamento da goiaba apresenta principalmente os compostos fenólicos, que são caracterizados pela sua atividade antioxidante, e seu consumo está associado com a prevenção de doenças cardiovasculares, neurológicas, metabólicas e até mesmo o câncer, desencadeados pelos radicais livres presentes no organismo humano (MARTINS, N.; BARROS; FERREIRA, 2016).

Para recuperar a fração bioativa de um resíduo vegetal, geralmente são empregados solventes orgânicos. Esses solventes são compostos com alta pressão de vapor, que

comprovadamente promovem a contaminação do analista desencadeando certos tipos de doenças correlacionadas ao uso frequente desses solventes, como problemas respiratórios, alergias, câncer e até mesmo a morte (TONG *et al.*, 2019; TORRES; PANDEY; CASTRO, 2011), também como, prejuízos ao meio ambiente (TONG *et al.*, 2019; WEI *et al.*, 2014) (geração de O<sub>3</sub>, possibilidade de causar incêndios, entre outros) (CLAUS; SOMMER; KRAGL, 2018; MAGIERA; SOBIK, 2017), por estes pontos negativos, existe um grande estímulo na comunidade científica para a pesquisa de solventes inovadores em substituição aos tradicionais solventes orgânicos.

Para contornar todos os aspectos prejudiciais no uso de solventes orgânicos, novas alternativas inovadoras têm sido estudadas com o intuito de substituir os mesmos, tais como a aplicação de líquidos iônicos (LIs).

Os LIs são compostos orgânicos iônicos, conceituados como substâncias que apresentam ponto de fusão abaixo de 100 °C, e que apresentam estabilidade térmica, química e eletroquímica, entre outras propriedades. Atualmente inúmeros estudos relacionam o uso de LI, no portal *Scopus* mais de seis mil trabalhos utilizam o termo “ionic liquid” no título, indicando o interesse da pesquisa na área e também grandes projeções econômicas (CLAUS; SOMMER; KRAGL, 2018; GOTI; CARDONA, 2013; HWANG *et al.*, 2018).

A principal característica desses compostos é que podem ser moldados de acordo com os objetivos da pesquisa, pois sua composição é definida pela junção de uma fração catiônica e uma fração aniônica, podendo ser combinados de inúmeras maneiras (BERTHOD; RUIZ-ÁNGEL; CARDA-BROCH, 2017; MARTINS, P. L. G.; BRAGA; DE ROSSO, 2017). É nesse sentido que os LIs estão sendo aplicados em diversas áreas, para a extração de metais na área da ciência dos alimentos (BAĀDA; TÜZEN, 2017), na extração de compostos fenólicos (CAO, J. *et al.*, 2017), na engenharia química para sínteses orgânicas (BERTHOD; RUIZ-ÁNGEL; CARDA-BROCH, 2017), no processamento de biomassa celulósica (FORT *et al.*, 2007), entre outras. Entretanto, a aplicação de LI para utilização na indústria de alimentos é limitada, pois ainda não existem estudos e evidências suficientes para doses residuais seguras em produtos e sua toxicidade para a saúde humana. Além disso, a aplicação de LIs como solventes extratores de compostos naturais para serem usados como aditivos em alimentos não é regulada pelas principais agências internacionais regulamentadoras, assim como a FDA (*Food and Drug Administration*, USA), *International Food Standards* (Codex Alimentarius) ou a Legislação da União Europeia (MARTINS, P. L. G.; BRAGA; DE ROSSO, 2017). É nesse sentido que alguns estudos usando células humanas *in vitro* (HWANG *et al.*, 2018) e modelos *in vivo* (LARANGEIRA *et al.*, 2016) foram conduzidos no sentido de investigar a toxicidade dos LIs.

Para que seja proposto um método inovador de extração, utilizando LIs por exemplo, é importante a utilização de ferramentas estatísticas que consigam processar e otimizar as respostas alvo de um experimento. Com o auxílio de planejamentos multivariados é possível obter a extração de compostos orgânicos com o melhor custo-benefício, economizando tempo, trabalho e consumo de reagentes químicos. Esse tipo de técnica é utilizada para avaliar como diferentes tipos de parâmetros (ex: tempo de extração, temperatura, potência de equipamento, entre outros) afetam uma extração. Além disso, é possível citar o uso da metodologia de superfície de resposta e função desejabilidade que tem por objetivo a maximização e otimização dos parâmetros estudados de acordo com as respostas de duas ou mais variáveis dependentes (NARENDERAN; MEYYANATHAN; KARRI, 2019).

Considerando o exposto, a utilização de LIs para a extração de compostos bioativos do resíduo do processamento da goiaba, em especial os compostos fenólicos, com reconhecida ação antioxidante, pode ser uma alternativa viável e inovadora. O emprego da extração com LI assistida por ultrassom tem como finalidade o desenvolvimento de uma metodologia simples, eficiente e confiável para a valorização desse resíduo agroindustrial. Esses aspectos serão investigados neste trabalho.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

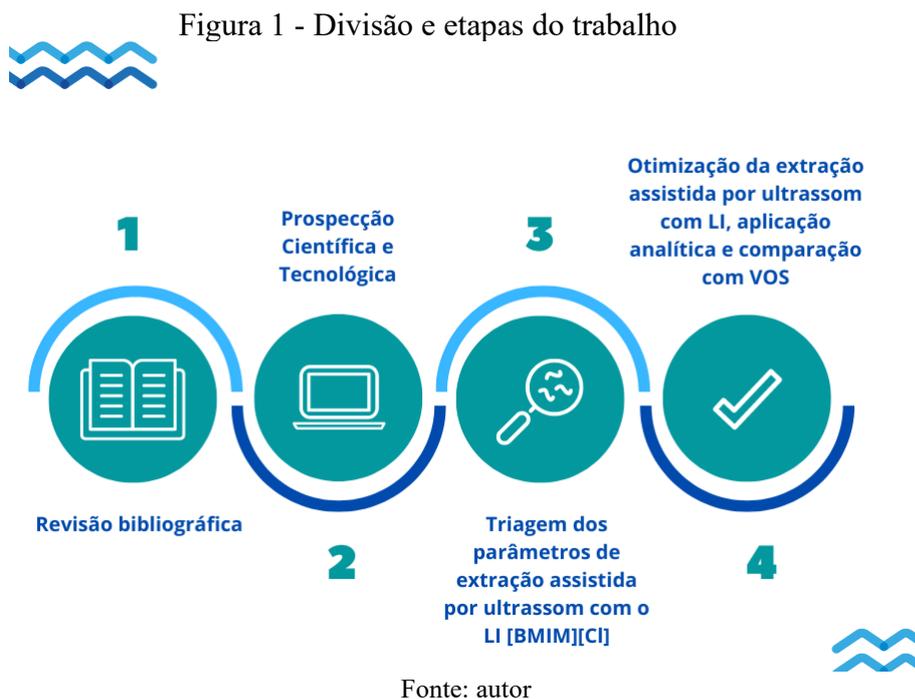
O presente trabalho teve como objetivo geral elaborar uma revisão bibliográfica, uma prospecção científica e tecnológica a respeito dos LIs para extração de bioativos, além de otimizar os parâmetros de extração e obter compostos fenólicos, do resíduo do processamento da goiaba utilizando extração com LI assistida por ultrassom (ELIAU) e comparando o extrato otimizado a solventes tradicionais na recuperação desses compostos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar, uma revisão a respeito das perspectivas de uso de LIs para a extração de compostos bioativos e seus aspectos toxicológicos, baseado nas regulamentações internacionais e com foco na aplicação tecnológica;
- Elaborar, uma prospecção científica e tecnológica sobre a utilização dos LIs;
- Sintetizar o LI [BMIM][Cl] e caracterizá-lo quanto a suas características de ponto de fusão e padrão de fragmentação;
- Realizar um planejamento fatorial completo para verificar a influência da concentração do LI [BMIM][Cl] na extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos com ação antioxidante do resíduo do processamento da goiaba;
- Realizar um planejamento fatorial completo para verificar os parâmetros significativos (tipo de LI, razão amostra/solvente, tempo e temperatura de extração) nas respostas de fenólicos totais e atividade antioxidante do resíduo do processamento da goiaba utilizando o método ELIAU;
- Realizar um delineamento composto central rotacional usando a função desejabilidade para obter uma condição de compromisso para extração ELIAU de compostos fenólicos do resíduo do processamento da goiaba;
- Aplicar a condição de compromisso para a extração ELIAU dos compostos fenólicos do resíduo do processamento da goiaba;
- Comparar a eficiência da condição de compromisso do método ELIAU frente a solventes tradicionais na extração de compostos fenólicos com ação bioativa do resíduo de processamento da goiaba.

### 3 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

O presente trabalho está dividido em 4 etapas, conforme a Figura 1. A primeira etapa contempla a revisão bibliográfica da tese, sendo que parte da mesma, foi aceita para publicação na revista *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (ANEXO A) com o título: *Uses of ionic liquids to obtain bioactive compounds: insights from the main international regulations for technological applications*. Para as etapas seguintes (2, 3 e 4) foram descritos os materiais e métodos e os resultados e discussão. A etapa 2 é caracterizada pelo desenvolvimento de uma Prospecção Científica e Tecnológica a respeito do uso de LIs para extração de compostos bioativos, publicada como capítulo do livro “Propriedade Intelectual, Estudos Prospectivos e Inovação Tecnológica” com o título “Panorama sobre o emprego de líquidos iônicos: prospecção científica e tecnológica” (ANEXO B). A etapa 3 do trabalho trata sobre a triagem dos parâmetros para a extração de compostos fenólicos e antioxidantes do resíduo do processamento da goiaba utilizando especificamente o LI [BMIM][Cl], e os resultados desta etapa foram organizados no artigo intitulado *Ultrasound-assisted extraction using [BMIM][Cl] ionic liquid as an effective method for recovering phenolic compounds from the coproduct of guava processing*. Na etapa 4 foi desenvolvido e otimizado um método para a extração de compostos bioativos do resíduo do processamento da goiaba utilizando LI, e comparado a vários VOS, que originou o artigo *Innovative approach for obtaining phenolic compounds from guava (Psidium guajava L.) coproduct using ionic liquid ultrasound-assisted extraction (IL-UAE)*, publicado na revista *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (ANEXO C).



## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA – ETAPA 1

### 4.1 GOIABA (*PSIDIUM GUAJAVA*), ASPECTOS NATURAIS, BIOLÓGICOS E MERCADOLÓGICOS.

Nativa do Caribe e das Américas do Sul e Central, *Psidium guajava*, popularmente conhecida como goiabeira é a árvore pertencente à família *Myrtaceae*, gênero *Psidium*, compreendendo mais de 160 cultivares principalmente em regiões tropicais e subtropicais do planeta (KORIEEM; ARBID; SALEH, 2019; SOUZA, T. S. *et al.*, 2018).

A planta é caracterizada por ser uma árvore média (aproximadamente 10 m) com longos galhos por sua volta, suas folhas são alongadas e apresentam formato oval, entre 5 a 15 cm de comprimento. A flor da goiabeira é branca com 4 a 6 pétalas que abrigam em seu interior pequenos estames com anteras amarelas (FLORES *et al.*, 2015; SANDA *et al.*, 2011; STONE, 1970).

A planta é reconhecida pelo seu aroma característico, sabor e valor nutricional da fruta, além disso, estudos reportam que o extrato da planta (folha, fruto e sementes) apresenta uma ampla composição química, composta por compostos fenólicos, taninos, flavonoides, alcaloides, triterpenos, saponinas, glicosidades, carotenoides, e ainda óleos essenciais, variando conforme condições ambientais e métodos de processamento (MACHADO *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2018).

A planta, considerando fruto, folha e semente, apresenta atividade anti-inflamatória, antioxidante (FLORES *et al.*, 2013), efeito analgésico (OJEWOLE, 2006), atividade antimicrobiana e hepato protetiva, entre outras (SANDA *et al.*, 2011). O extrato das folhas da goiabeira apresenta uma série de compostos bioativos, sendo utilizado popularmente no trato de doenças como inflamações, diabetes, febre, hipertensão, doenças pulmonares e úlceras. Além disso, o óleo essencial das folhas é responsável por propriedades antioxidantes, antiproliferativas e antimicrobianas (FLORES *et al.*, 2015; KORIEM; ARBID; SALEH, 2019; RAKMAI *et al.*, 2018).

Após 2 a 4 anos da germinação da semente, a árvore frutifica dando origem a goiaba. De formato oval variando entre 3 a 10 cm de diâmetro, casca de coloração verde a amarelo, e dependendo da variedade, a cor da polpa pode variar entre branca, amarelo claro, rosa ou salmão (IDSTEIN; SCHREIER, 1985; MCCOOK-RUSSELL *et al.*, 2012; MERCADANTE; STECK; PFANDER, 1999).

Classificada como climatérica, a goiaba apresenta período de maturação rápido e curta vida útil após colheita, pois apresenta elevada taxa de respiração pós-colheita, diminuindo seu *shelf life*, tornando-se mole em temperatura ambiente em torno de 6 a 8 dias pois o conteúdo de pectina estrutural é afetado, sendo então uma fruta de rápida deterioração, impactando em perdas econômicas (BATISTA SILVA *et al.*, 2018; NAIR; SAXENA; KAUR, 2018; NUNES *et al.*, 2016; SPILLER *et al.*, 2018).

A goiaba é uma fruta nutritiva, que fornece de 150 a 209 calorias a cada 100 g de fruta. É também chamada de “superfruta”, em função do seu conteúdo de compostos com ação antioxidante. A goiaba contém elevada concentração de vitaminas (provitamina A, B e C) e minerais (ferro, cálcio e fósforo), além de conter altos níveis de compostos fenólicos que justificam a característica antioxidante do fruta (ALMULAIKY *et al.*, 2018; FLORES *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2019; NETO, 2007).

A goiaba possui uma composição rica em compostos bioativos, tais como os carotenoides e compostos fenólicos, incluindo, licopeno,  $\beta$ -caroteno, taninos, flavonoides, antocianinas, proantocianidinas, triterpenos e saponinas. Além disso, apresenta óleos essenciais, ácidos graxos e fibras (ALMULAIKY *et al.*, 2018; CAMPOLI *et al.*, 2018; FLORES *et al.*, 2015).

Considerando a polpa, sementes e casca da goiaba, já foram identificados 37 compostos fenólicos, dentre ácidos fenólicos, flavonoides, aldeídos fenólicos, coumarinas e diterpenos, com destaque ao ácido elágico, responsável por até 71 % (m/m) do conteúdo fenólico total (LIMA *et al.*, 2019).

Devido a seus vários nutrientes, e em comparação com outras frutas assim como a laranja, a goiaba apresenta um conteúdo superior entre três a seis vezes de vitamina C, o mesmo acontece com o licopeno, que é o dobro do composto em comparação com o tomate (BATISTA SILVA *et al.*, 2018; NINGA *et al.*, 2018). Assim, o consumo da fruta está associado à redução dos níveis de colesterol sanguíneo, triglicerídeos e hipertensão, sendo benéfica no aumento dos níveis de colesterol HDL (*high-density lipoprotein*) (MURMU; MISHRA, 2018).

A Tabela 1 apresenta um compilado sobre a composição majoritária tanto da goiaba *in natura* quanto do resíduo de seu processamento.

Tabela 1 - Composição majoritária da goiaba *in natura* e do resíduo de seu processamento

	Goiaba <i>in natura</i>	Ref	Resíduo do processamento da goiaba	Ref
Umidade (%)	85		3,97	
Proteínas (%)	1,1		2,07	Casarotti et al. (2018)
Lipídeos (%)	0,4		1,2	
Cinzas (%)	0,5		0,83	
Manganês (mg/100 g)	0,09		-	
Fósforo (mg/100 g)	15	UNICAMP (2011)	-	
Ferro (mg/100 g)	0,2		-	
Potássio (mg/100 g)	198		-	
Cobre (mg/100 g)	0,04		-	
Zinco (mg/100 g)	0,1		-	
Carboidratos (%)	13		2,13	Casarotti et al. (2018)
Frutose (%)	6,19	Rojas-Garbanzo et al. (2019)	-	
Glicose (%)	4,5		-	
Sacarose (%)	7,86		-	
Fibra dietética total (%)	6,2	UNICAMP (2011)	89,8	
Fibra insolúvel (%)	-		86,1	Casarotti et al. (2018)
Fibra solúvel (%)	-		3,7	
β-caroteno (µg/g)	12	Rodrigues-Amaya (2008)	7,91	
Licopeno (µg/g)	53		4,77	
Carotenoides totais (µgRAE/100g)	100		-	
Vitamina B6 (Piridoxina) (mg/100 g)	0,03	UNICAMP (2011)	-	
Vitamina C (ácido ascórbico) (mg/100 g)	80,6		-	
Compostos fenólicos totais (EAG mg/100 g)	124 - 227,9 - 383	Freire et al. (2013);	253,14	Casarotti et al. (2018)
Atividade antioxidante (µmol TE/g)	27,1 - 56,3	Hamid Musa, Abdullah, Subramaniam (2015)	17,37	
Atividade antioxidante (EAA mg/100 g)	1595 - 2490		-	

-: não avaliado. RAE: atividade de retinol equivalente. EAG: equivalente em ácido gálico. TE: Trolox equivalente. EAA: equivalente ácido ascórbico.

Para suprir a demanda pelo fruto, a produção mundial de goiaba é realizada principalmente no Brasil, Colômbia, México e Venezuela, sendo estimada uma quantidade de aproximadamente 500.000 toneladas da fruta, que pode ser consumida *in natura* ou processada como bebidas, sorvetes, geleias e compotas (MCCOOK-RUSSELL *et al.*, 2012).

A produção brasileira em escala industrial de goiaba começou no início da década de 70 com vistas ao mercado nacional e internacional. Dados recentes indicam que a produção da goiaba no ano de 2016 foi de 17.119 hectares colhidos. Atualmente, dados da produção do ano de 2019 indicam um volume de 584.00 toneladas da fruta (BRAZILIAN INSTITUTE FOR

GEOGRAPHY AND STATISTICS, 2019), movimentando financeiramente mais de meio milhão de reais. A fruta é também exportada para diversas regiões do mundo, pois é considerada exótica em algumas regiões como Estados Unidos e União Europeia. Cerca de 143.000 kg da fruta foram exportados para outros países no ano de 2017 (KIST *et al.*, 2018; NETO, 2007).

A goiaba apresenta período de safra entre janeiro e abril, sendo comercializada e consumida fresca (*in natura*) ou processada em diversos produtos. Estima-se que no Brasil o processamento da goiaba seja em torno de 53% de toda a produção, dando origem a alimentos como sucos, purê, doces e sorvetes (DEL'ARCO; SYLOS, 2018; MOON, P. *et al.*, 2018).

No processamento da goiaba uma grande quantidade de resíduo é gerada, compreendendo sementes, casca e sobras de polpa. É estimado que 30 % de todo o volume processado seja correspondente ao resíduo, que muitas vezes é descartado inadequadamente, gerando impactos ambientais de acordo com a demanda biológica de oxigênio necessária para sua biodegradação (LIMA, R. da S. *et al.*, 2019).

Se considerado o volume apresentado anteriormente, onde 53 % (estimativa do volume de processamento) da produção de 2019 equivale a 309.520 toneladas, cerca de 92.856 toneladas são equivalentes aos resíduos dos processos, sendo esses resíduos atrativos justamente pela sua composição rica em compostos com atividade biológica (MILANI *et al.*, 2018).

Esse material de descarte vem sendo estudado para diferentes aplicações: como alimentação para aves (CAMELO *et al.*, 2015; LIRA *et al.*, 2009), uso na fertilização de solos (MANTOVANI *et al.*, 2004; SEBEN JUNIOR *et al.*, 2011; SOUZA, H. A. De; NATALE; ROZANE, 2011), na produção de biscoitos (ABUD; NARAIN, 2010; BERTAGNOLLI *et al.*, 2014), na elaboração de produtos fermentados (DARMASIWI *et al.*, 2018), para a extração de compostos fenólicos (HASSAN *et al.*, 2016; LIMA, R. da S. *et al.*, 2019), para extração de ácidos fenólicos para incorporação em filtro solar (MILANI *et al.*, 2018), como adsorvente para descontaminação de águas subterrâneas (RAMOS-VARGAS *et al.*, 2018), entre outros.

Em geral, em torno de 30 a 40 % da produção de alimentos para consumo humano é perdida ou adotada como resíduo em diferentes partes do mundo, quantidade que está associada principalmente ao processamento industrial. Com o crescente aumento populacional, estratégias que visem suprir a demanda de alimentos se apoiam na redução de perdas e/ou diminuição, e principalmente na valorização de resíduos, os quais muitas vezes apresentam composição rica em diferentes classes de compostos, sendo uma das principais classes os compostos bioativos, de interesse industrial, alimentício e farmacológico, (BANERJEE *et al.*, 2017; DE LAURENTIIS; CORRADO; SALA, 2018).

Sendo assim, a goiaba é um produto vegetal rico em compostos bioativos, em especial compostos fenólicos que tem como principal função a sua ação antioxidante, a qual será discutida no item a seguir.

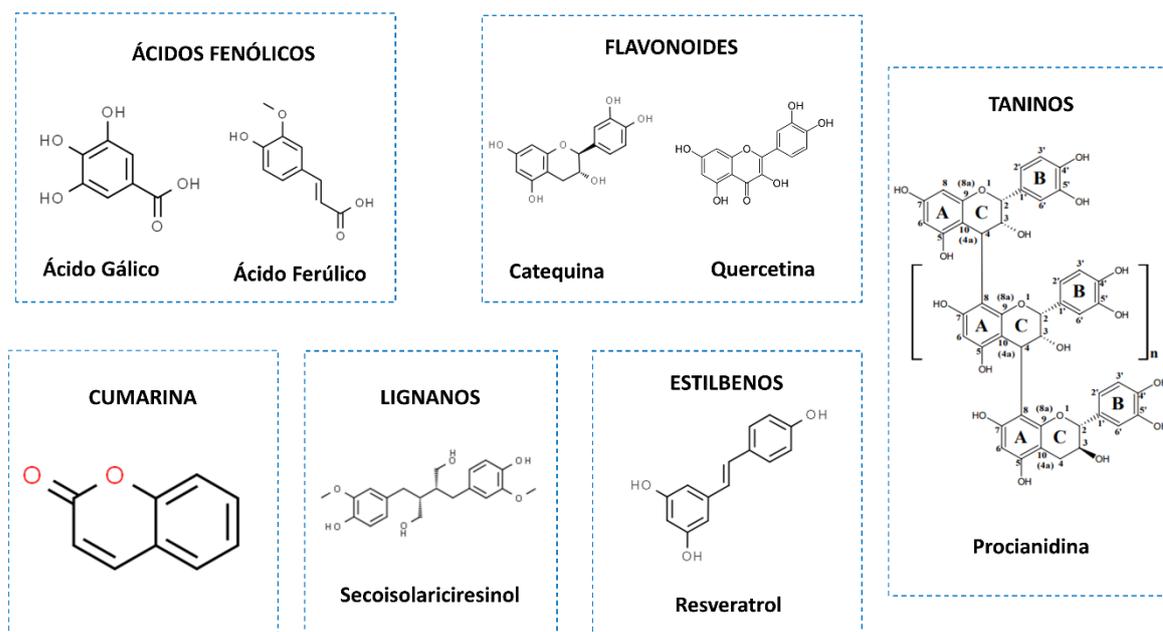
#### 4.2 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

Os compostos fenólicos desempenham importantes funções no organismo humano. Por essas características, estão entre as substâncias naturais com maior número de estudos atualmente. Provenientes de organismos vegetais, há o conhecimento de pelo menos 8000 compostos polifenólicos, os quais apresentam uma complexa e variada composição química (DIAS *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2017).

Sendo exclusivamente provenientes de organismos vegetais, o corpo humano não tem a capacidade de sintetizar essas substâncias, portanto, somente pela alimentação é possível suprir as necessidades diárias dos compostos polifenólicos. Em média, o consumo diário desses compostos é de aproximadamente 1 g por pessoa, os quais são facilmente adquiridos quando adotada uma alimentação rica em frutas e vegetais (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015; ZUORRO; MAFFEI; LAVECCHIA, 2016).

Os compostos polifenólicos são característicos do metabolismo secundário de plantas (ZUORRO; MAFFEI; LAVECCHIA, 2016), que é ativado em condições ambientais desfavoráveis, como alterações na luz solar (radiação UV) e ataque de organismos patogênicos (NIÑO-MEDINA *et al.*, 2017; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). Quimicamente, os compostos fenólicos podem ser reconhecidos por uma hidroxila (-OH) ligada a um anel benzênico ou em estruturas aromáticas complexas. De acordo com seus radicais substituintes, essa classe de compostos pode ser classificada em subgrupos, como os ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, coumarinas, lignanos e estilbenos, demonstrados na Figura 2. De modo geral os compostos fenólicos, principalmente quando em sinergia, são conhecidos como agentes preventivos de espécies reativas de oxigênio e radicais livres, atuando como agente redutor, inibidor de oxigênio singlete e ainda quelando metais responsáveis pelo desencadeamento de reações de oxidação (BELWAL *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2017; ZUORRO; MAFFEI; LAVECCHIA, 2016).

Figura 2 - Classes dos compostos fenólicos e exemplos



Fonte: autor

Essa atuação está diretamente relacionada com a atividade antioxidante que os polifenólicos desempenham, e conseqüentemente a prevenção de doenças cardiovasculares, neurológicas, metabólicas e até mesmo o câncer, desencadeados pelos radicais livre presentes no organismo humano (MARTINS; BARROS; FERREIRA, 2016).

Processos oxidativos ocorrem naturalmente em porções lipídicas e podem ser catalisados pela ação da luz, temperatura e enzimas, ocasionando deterioração nos alimentos (SHAHIDI; ZHONG, 2015).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são responsáveis pela transformação dos radicais livres em produtos primários (hidroperóxidos) e secundários (álcoois, aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos, ácidos orgânicos voláteis e epóxidos) de degradação, proporcionando aroma e gosto característicos nos alimentos (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015; SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Nesse aspecto, substâncias antioxidantes são aquelas presentes nos alimentos ou no organismo humano (adquiridas através de alimentação) que em baixas concentrações retardam, controlam e previnem o estresse oxidativo em organismos vegetais e em células do corpo humano. Esses compostos são naturalmente encontrados em plantas e em alguns micro-organismos ou podem ser sintetizados quimicamente (SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Os compostos fenólicos são classificados como antioxidantes primários e possuem diversos efeitos bioativos no corpo humano, seu principal efeito é a ação antioxidante, que está atrelada a contribuição na captura de radicais livres espalhados pelo organismo através da doação de um átomo de hidrogênio ou elétron para essas espécies, também como acceptor de radicais livres formando produtos mais estáveis. A ação antioxidante atua diminuindo a concentração de oxigênio, inibindo a ação de espécies reativas de oxigênio singlete, prevenindo os primeiros mecanismos oxidativos de iniciação da reação em cadeia, assim como radicais OH; e decompondo os produtos primários da oxidação em espécies não reativas inibindo o desenvolvimento da reação em cadeia (ALSHIKH; DE CAMARGO; SHAHIDI, 2015; SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Outra ação bioativa dos compostos fenólicos é a capacidade destes de se ligar a íons metálicos que em estado livre que são prejudiciais ao organismo, sendo responsáveis por desencadear séries de reações de oxidação, que afetam os mecanismos bioquímicos que envolvem os lipídeos, proteínas, e também o DNA (ALSHIKH; DE CAMARGO; SHAHIDI, 2015; LI, J.; GUO, 2016; SINGH *et al.*, 2017).

Devido ao fato do aumento da exigência dos consumidores por produtos elaborados com fontes naturais, os compostos polifenólicos como agentes antioxidantes atualmente atraem atenção como aditivos naturais ao contrário dos sintéticos (BHA, BHT, TBHQ) usualmente utilizados pela indústria de alimentos, os quais inclusive tem uso limitado e regulamentado pela *Food and Drug Administration* (FDA). Diante de tal relevância, os estudos sobre os compostos fenólicos têm atraído a atenção de pesquisadores das áreas da nutrição, ciência, engenharia e tecnologia em alimentos tanto pelas propriedades funcionais quanto para suas múltiplas aplicações tecnológicas (LI, J.; GUO, 2016; SHAHIDI; ZHONG, 2015; SINGH *et al.*, 2017; ZUORRO; MAFFEI; LAVECCHIA, 2016) .

#### **4.2.1 Determinação da atividade antioxidante**

Para a determinação da atividade antioxidante de um composto natural, é necessário que seja realizado um procedimento de extração deste de sua matriz. A maioria dos compostos antioxidantes citados anteriormente são fracamente solúveis em água. A solubilidade está associada a polaridade de um solvente, que pode acessar e manter o soluto através de forças intermoleculares de atração (RECHARLA *et al.*, 2017; REZAEI; FATHI; JAFARI, 2019).

Diferentes técnicas foram desenvolvidas ao longo dos anos para a quantificação da atividade antioxidante de um determinado produto ou composto. Os métodos existentes de

captura de radicais são baseados nos mecanismos de transferência de átomo de hidrogênio ou na transferência de um único elétron. O primeiro baseia-se na habilidade dos compostos antioxidantes em sequestrar um radical livre através da doação de hidrogênio, o segundo baseia-se na habilidade dos compostos antioxidantes em transferir elétrons, atuando como agentes redutores de metais ou radicais por exemplo (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

Dentre os métodos para a quantificação da capacidade antioxidante podemos citar alguns exemplos, como o DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), que é o mais frequentemente empregado. O método é baseado na redução do radical DPPH pelos compostos que apresentam potencial antioxidante na amostra a ser analisada. A quantificação é relacionada com padrões de antioxidantes naturais como ácido ascórbico e sintéticos como o Trolox (análogo da vitamina E, porém, solúvel em água). A avaliação da redução do DPPH é realizada através da mudança de cor durante a reação, sendo passível de ser medida comumente por espectrometria UV-Vis devido a sua simplicidade e baixo custo (ZIYATDINOVA; SNEGUREVA; BUDNIKOV, 2017). Outro método frequentemente utilizado para a avaliação do potencial antioxidante é através do ensaio de ABTS, o qual é adequado para compostos antioxidantes tanto hidrofílicos quanto lipofílicos, e baseia-se na capacidade de um composto antioxidante de capturar o radical  $ABTS^{\bullet+}$  (RUFINO *et al.*, 2007).

Outro exemplo de técnica de avaliação do potencial antioxidante bastante difundida é a técnica de FRAP (*ferric reducing antioxidant power*). A análise é baseada na habilidade que os compostos antioxidantes exercem na redução do Fe (III) a Fe (II), a reação desenvolve coloração passível de ser quantificada por espectrometria UV-Vis (JONES *et al.*, 2017).

Modelos de avaliação antioxidante *in vitro*, na maioria dos casos, simulam condições que não condizem com a realidade *in vivo*, utilizando de substâncias químicas que não são naturalmente produzidas pelo organismo. Atualmente muitos estudos utilizam da extrapolação de modelos *in vitro* para sugerir um alimento bioativo, contudo não levam em consideração o metabolismo de cada indivíduo, nem mesmo as doses necessárias para a eficácia de um composto bioativo. Sendo assim, muitas técnicas de avaliação da atividade antioxidante *in vitro* são consideradas biologicamente irrelevantes (ARAGONÈS *et al.*, 2017; SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Uma alternativa aos métodos *in vitro* é a utilização de sistemas biológicos para obter uma simulação mais clara dos processos que ocorrem naturalmente. Um dos métodos utilizados é a inibição da peroxidação lipídica em gema de ovo, onde utiliza-se a gema que é fonte de fosfolípídeos e triacilgliceróis para estimular a peroxidação e avaliar a eficiência de um extrato antioxidante na inibição dessa reação (DAKER *et al.*, 2007; MARGRAF *et al.*, 2016).

Outros estudos relacionando a atividade antioxidante de extratos vegetais em modelo *in vivo* já foram avaliados em células eucarióticas e em animais (ratos, coelhos, porcos, peixes, entre outros), porém não em humanos. A ação dos antioxidantes no organismo humano é atrelada a uma série de reações bioquímicas durante os processos de digestão e absorção. Enquanto que alguns compostos são ingeridos e naturalmente ativados, outros precisam ser metabolizados para que sua biodisponibilidade seja acessada, outros ainda podem tornar-se inativos, ou ainda sofrer a ação competitiva de outros nutrientes ingeridos concomitantemente (MARTINS, N.; BARROS; FERREIRA, 2016).

Pela sua grande relevância, os compostos fenólicos devido a sua ação antioxidante são estudados em diversas áreas, apresentando em comum a avaliação das etapas e os estudos de métodos de extração desses compostos de matrizes vegetais. Frequentemente são utilizados métodos que empregam os VOS, porém processos mais modernos podem empregar solventes inovadores, como os LIs. Essas aplicações serão descritas a seguir.

### 4.3 SOLVENTES PARA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

#### 4.3.1 Uso de solventes orgânicos clássicos no preparo de amostras

Técnicas analíticas geralmente empregam substâncias químicas (reagentes e soluções) para o preparo de amostra, assim como técnicas de extração utilizam solventes orgânicos. Esses compostos apresentam uma alta pressão de vapor, ou seja, uma grande tendência natural para a volatilização, ocasionando contaminações tanto para o laboratorista quanto para o ambiente (CLAUS; SOMMER; KRAGL, 2018; MAGIERA; SOBIK, 2017).

Os solventes orgânicos voláteis (VOS, do inglês *volatile organic solvents*) são um grupo de substâncias químicas que tem sido utilizada para a dissolução de uma grande variedade de compostos e para diferentes finalidades. São utilizados no setor industrial têxtil, químico, farmacêutico, na engenharia de alimentos e também em indústrias de impressão (AMADO ALVIZ; ALVAREZ, 2017; LI; SMITH; STEVENS, 2016; MA *et al.*, 2019).

Sabe-se que a classe dos VOS é prejudicial à saúde humana, pois os mesmos têm a capacidade de participar de reações fotoquímicas atmosféricas aumentando a oxidação do ar atmosférico e conseqüentemente a produção de O<sub>3</sub> (TONG *et al.*, 2019; WEI *et al.*, 2014).

Por essas e demais razões que a exposição humana frequente a VOS não é saudável, os reagentes também são capazes de se ligar a membrana celular afetando sua integridade (TORRES; PANDEY; CASTRO, 2011), e causar danos no sistema nervoso central, além de

efeitos neurotóxicos, problemas respiratórios, irritações sensoriais, alergias, asma, risco de câncer como leucemia (TONG *et al.*, 2019), e até mesmo a morte.

Solventes orgânicos são comumente aplicados para a extração de compostos naturais, e as técnicas utilizadas demandam de um grande volume de VOS e tempo elevado de extração. Além disso, depois de obtidos os extratos, faz-se necessário o uso de muitos processos para remover os VOS do extrato final. O uso desse tipo de reagente apresenta ainda outras desvantagens, principalmente a sua toxicidade, poluição ambiental e seu alto risco de explosão, uma vez que são inflamáveis (DJAS; HENCZKA, 2018; MOON, *et al.*, 2019).

Solventes como benzeno, n-hexano, éter etílico, éter dietílico, diclorometano, clorofórmio, etc., são utilizados desde seu descobrimento; no entanto, hoje em dia foram amplamente classificados como perigosos e o uso foi severamente marginalizado (SHELDON, 2019).

Os VOS ainda são amplamente utilizados, por exemplo, na extração de compostos polifenólicos (acetato de etila e metanol) (SCHULZ *et al.*, 2019a), para verificar o efeito neuroprotetivo de extratos vegetais (metanol, hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) (SCHULZ *et al.*, 2019b), no preparo de extratos para avaliação do potencial antimicrobiano (metanol, acetona, éter dietílico, e etanol) (TÜNEY *et al.*, 2006), para avaliação do potencial antioxidante de matrizes vegetais (metanol, hexano, acetato de etila e butanol) (VALENTE *et al.*, 2010), para a extração de licopeno (hexano, acetona e etanol) (MIN *et al.*, 2018), para extração de lipídeos (clorofórmio e metanol) (BARIK; PAUL, 2017; MOHANTY *et al.*, 2017), etc.

Historicamente, o uso contínuo dos VOS pode ser atribuído ao fato de não haver outros substitutos disponíveis com as mesmas características ou devido à conveniência ou facilidade do uso de métodos tradicionais por laboratórios químicos. Essas razões explicam a resistência de adotar novas técnicas e solventes ecológicos e inovadores, tanto para pesquisa quanto para processos industriais (SHELDON, 2019; TOBISZEWSKI e NAMIEŚNIK, 2017)

Recentemente, órgãos internacionais assim como o REACH (*Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals* – associação da Agência Europeia de Químicos) têm incentivado o uso e a pesquisa por soluções inovadoras para substituição dos VOS, implementado regras mais restritas em relação a utilização dos mesmos, resultando em um aumento de custos de uso, armazenamento e descarte desses materiais, e inclusive em alguns casos já consta a proibição de alguns desses solventes (DJAS; HENCZKA, 2018; LI; SMITH; STEVENS, 2016).

Nesse sentido, novos solventes têm sido considerados uma alternativa aos convencionais, é nesse sentido que os líquidos iônicos (LIs) podem ser opções inovadoras para atender a demanda de substituição dos VOS.

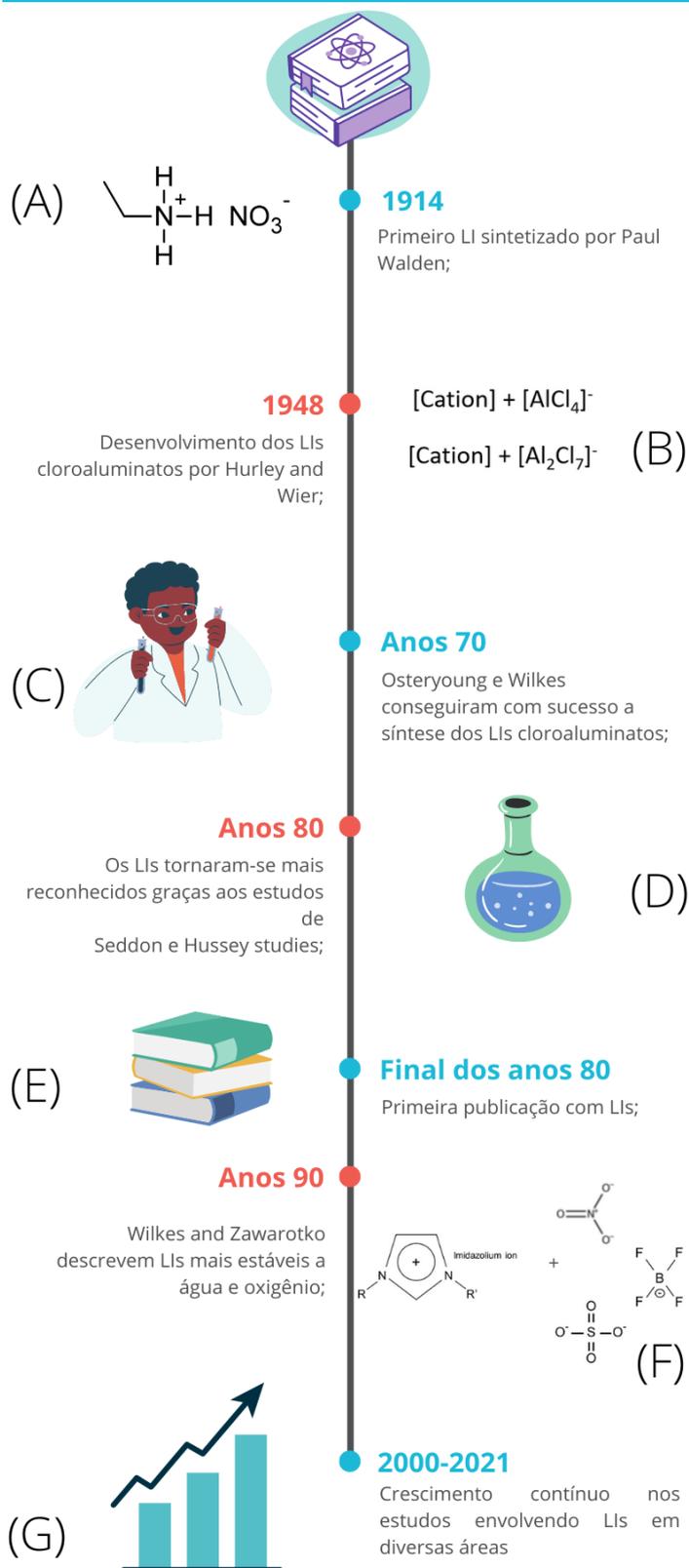
#### 4.3.2 Líquidos iônicos: histórico, aspectos gerais, químicos e físicos

Líquidos iônicos (LI) são substâncias que consistem inteiramente de íons com baixa pressão de vapor. O termo LI é utilizado especificamente para sais líquidos a temperatura ambiente, ou podem ser compreendidos como substâncias que apresentam ponto de fusão abaixo de 100 °C (CLAUS; SOMMER; KRAGL, 2018; GOTI; CARDONA, 2013; HWANG *et al.*, 2018).

A Figura 3 sintetiza os eventos significantes na história dos LIs. O composto nitrato de etilamônio ( $[\text{C}_2\text{H}_5\text{NH}_3]^+ [\text{NO}_3]^-$ ) foi o primeiro líquido iônico sintetizado por Paul Walden em 1914 (Figura 3A). Mais tarde, em 1948, os LIs cloroaluminatos (ânions:  $[\text{AlCl}_4]^-$ ,  $[\text{Al}_2\text{Cl}_7]^-$ ) foram desenvolvidos por Hurley e Wier (Figura 3B). Entretanto, esse LI não foi estudado até os anos 70, quando o grupo de Osteryoung e Wilkes conseguiu sucesso na preparação dos LIs cloroaluminatos (Figura 3C). Naquele tempo, a maioria das pesquisas na área dos LIs eram focadas em aplicações eletroquímicas (CLAUS; SOMMER; KRAGL, 2018; FRANZOI *et al.*, 2011; WASSERSCHEID; KEIM, 2000).

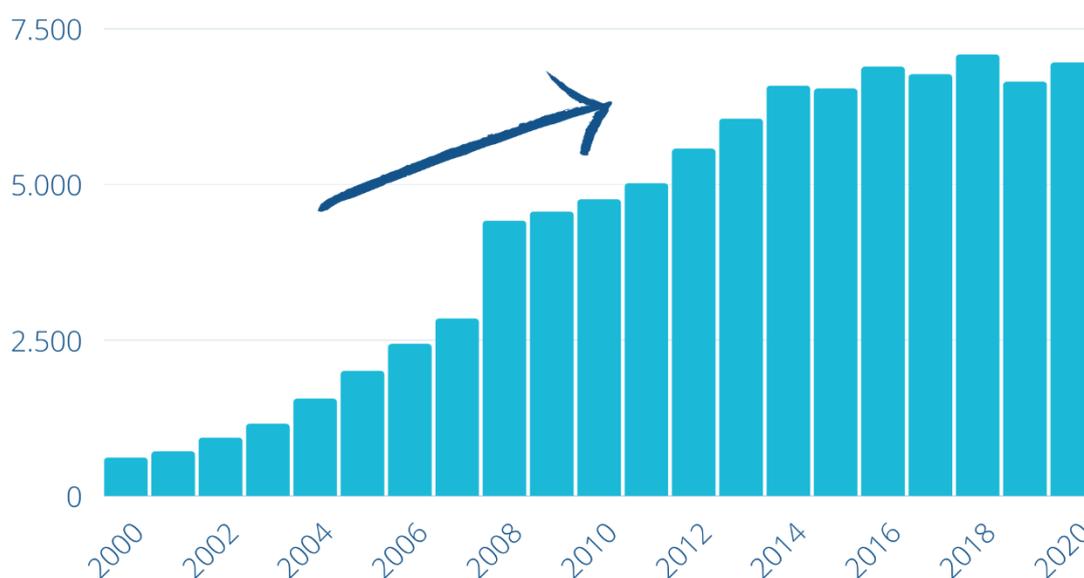
Nos anos 80, o uso de LIs começou a ganhar reconhecimento no meio científico graças aos grupos de Seddon e Hussey, que usaram os LIs cloroaluminatos como solventes não aquosos para investigar complexos de metais de transição (Figura 3D). Dessa maneira, a primeira publicação usando LI foi reportada no final dos anos 80 (Figura 3E), e na sequência, no início dos anos 90, Wilkes e Zawarotko descreveram uma classe de LIs mais estável a água e oxigênio, baseado no cátion imidazólio ([MIM]) e usando tetrafluoroborato ( $[\text{BF}_4]^-$ ), nitrato ( $[\text{NO}_3]^-$ ) e sulfato ( $[\text{SO}_4^{2-}]$ ) como ânions (Figura 3F). Essa nova classe apresentou uma maior possibilidade de aplicações em relação aos LIs cloroaluminatos, sendo responsável então pelo contínuo crescimento nos trabalhos científicos da área (Figura 3G) (CLAUS; SOMMER; KRAGL, 2018; FRANZOI *et al.*, 2011; WASSERSCHEID; KEIM, 2000).

Figura 3 - Linha do tempo dos eventos significantes na história do desenvolvimento dos LIs



Em função de sua versatilidade, o número de estudos relacionando o uso dessas substâncias aumentou nas duas últimas décadas (Figura 4), assim como o número de LIs com diferentes configurações estruturais que atualmente pode ser estimado em mais de  $10^{14}$  substâncias. Economicamente estima-se um crescimento anual de 9,2 % entre os anos de 2016 a 2021, e seu faturamento pode alcançar 39,6 milhões de dólares até o final do período (CLAUS; SOMMER; KRAGL, 2018; GOTI; CARDONA, 2013; HWANG *et al.*, 2018). O emprego dos LIs pode ser melhor observado na etapa 2 deste trabalho, onde foi realizada uma prospecção científica e tecnológica abordando o estado atual dessa temática em relação produção de documentos científicos e desenvolvimento de patentes.

Figura 4 - Documentos relacionando o tema "ionic liquid", no título, resumo e palavras-chave em diversos manuscritos.

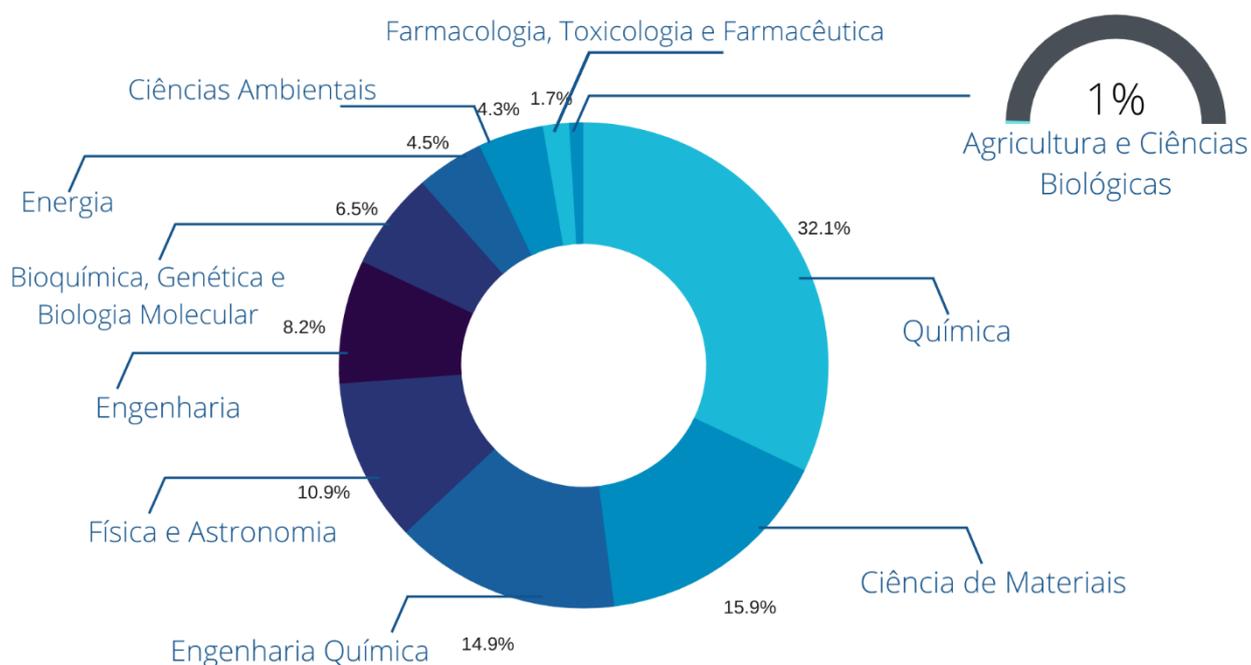


Fonte: adaptado de Scopus (2021).

O uso de LIs tem sido relatado em diversos tipos de pesquisas e áreas da ciência. A Figura 5 destaca o número de trabalhos publicados levando em consideração a busca pelo termo "ionic liquid" (em títulos, resumos, palavras-chave sem o uso de filtro temporal) de acordo com as dez maiores áreas em que LIs são estudados. A Química é a principal área, responsável pela publicação de aproximadamente 70.000 artigos (até o momento), seguido pela Ciência de Materiais (33.177 trabalhos) e Engenharia Química (31.139 documentos). Devido a versatilidade dos LIs, é possível observar seu uso na área de Energia (9.312 documentos), e até mesmo na área da Bioquímica, Genética, e Biologia Molecular (13.554 documentos). A área

de Ciência dos Alimentos encontra-se dentro da área de Agricultura e Ciências Biológicas, as quais apresentam o menor número de documentos (1986), representando cerca de 1% do número de trabalhos das 10 maiores áreas que pesquisam LIs. O reduzido número de trabalhos na área sugere o baixo número de pesquisas na aplicação de LIs para a recuperação de compostos bioativos, por exemplo.

Figura 5 - Top dez áreas com maior número de documentos relacionados ao termo "*ionic liquid*" em títulos, resumos e palavras-chaves



Fonte: adaptado de Scopus (2021).

Dentre as principais características dos líquidos iônicos é possível relatar que a maioria são substâncias não inflamáveis e não voláteis, resultado da prevalência de força de atração de Coulomb, são também compostos que podem proporcionar reações limpas, com o mínimo de perda, o que contribui para diminuição da geração de resíduos (NESSIM; ZAKY; DEYAB, 2018). Além disso, os líquidos iônicos apresentam maior viscosidade e densidade, excelente solubilidade e miscibilidade (CLAUS; SOMMER; KRAGL, 2018), boa estabilidade química, térmica e eletroquímica (CHEN, M. *et al.*, 2018; MARTINS, P. L. G.; BRAGA; DE ROSSO, 2017).

Foram nos últimos 10 anos que os LI atraíram a atenção da comunidade científica e industrial como alternativa aos solventes orgânicos. Tanto suas propriedades tecnológicas incomuns quanto suas características físico-químicas, tem chamado a atenção principalmente

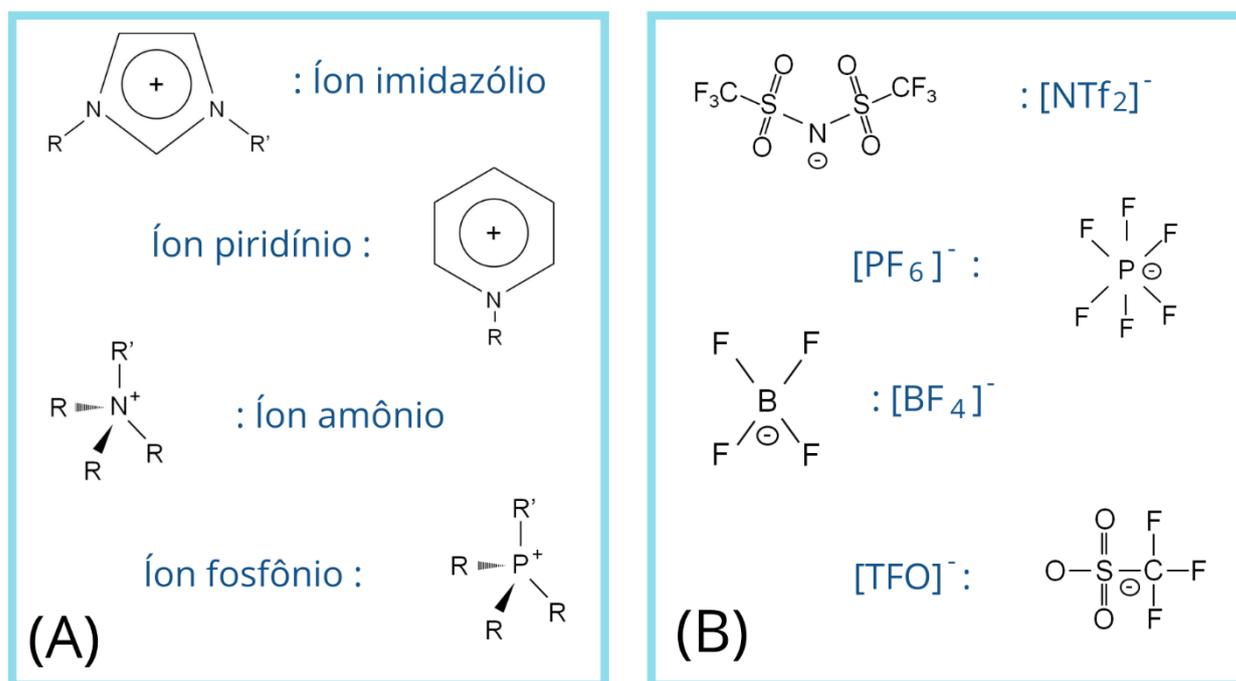
em substituição aos solventes orgânicos convencionais largamente utilizados em indústrias e instituições de pesquisas para extração de compostos de interesse (BUBALO *et al.*, 2013; CLAUS; SOMMER; KRAGL, 2018; GOTI; CARDONA, 2013; MARTINS, P. L. G.; BRAGA; DE ROSSO, 2017).

Como é possível moldar as frações aniônicas e catiônicas formadoras dos LIs, estes podem ter suas propriedades físicas facilmente alteradas conforme a mudança dessas frações, ajustando então o solvente ao propósito de cada pesquisa, sendo essa propriedade que torna os LIs mais atraentes em relação aos orgânicos convencionais (VENTURA *et al.*, 2017). A solubilidade dos LIs em diferentes solventes orgânicos já foi reportada, sendo assim os mesmos podem participar como co-solventes em diversos processos, atuando em sistemas binários juntamente com água ou outros solventes orgânicos, otimizando processos (HUDDLESTON *et al.*, 1998; SABA *et al.*, 2015).

Para a utilização como solvente, sabe-se que a polaridade estimada de alguns LIs (específico para cada LI) pode ser próxima a de solventes como acetona, acetonitrila, metanol, e até mesmo a água. Outra vantagem na utilização de LI como solvente extrator é sua recuperação, esses reagentes podem ser isolados das matrizes após sua utilização e empregados novamente em futuras extrações (BERTHOD; RUIZ-ÁNGEL; CARDA-BROCH, 2017; RYKOWSKA; ZIEMBLIŃSKA; NOWAK, 2018).

Também chamados de “*designer solvents*” os LIs são substâncias que podem ser moldadas de acordo com o propósito. Constituem-se basicamente de um cátion assimétrico orgânico e uma ampla gama de ânion de natureza orgânica ou inorgânica, agregados por ligações de hidrogênio entre os diferentes estados físicos de cada matéria, porém formando um sistema fluído. Os cátions mais comuns são: imidazólio, piridínio, pirrolidínio e seus mono ou poli-alkyl derivados, assim como tetraalquil amônio ou fosfônio e triaquil sulfônio (Figura 6A) (BERTHOD; RUIZ-ÁNGEL; CARDA-BROCH, 2017; MARTINS, P. L. G.; BRAGA; DE ROSSO, 2017).

Figura 6 – Cátions (A) e ânions (B) comumente utilizados para a síntese de LI



Fonte: adaptado de Wasserscheid e Keim (2000).

Os ânions mais comumente utilizados são: bis(trifluorometilsulfonyl)imida (NTf<sub>2</sub>), trifluorometilsulfato (TfO), dicianamida (N(CN)<sub>2</sub>), tetrafluoroborato (BF<sub>4</sub>) ou hexafluorofosfato (PF<sub>6</sub>) (Figura 6B). (BERTHOD; RUIZ-ÁNGEL; CARDA-BROCH, 2017; MARTINS, P. L. G.; BRAGA; DE ROSSO, 2017).

Por sua grande versatilidade, a utilização dos LI é destaque para diversas finalidades, incluindo a solubilização de diversas espécies químicas, tais como compostos orgânicos, inorgânicos e organometálicos, ainda para o uso em sínteses orgânicas, na engenharia química (BERTHOD; RUIZ-ÁNGEL; CARDA-BROCH, 2017), processamento de biomassa celulósica (FORT *et al.*, 2007; SWATLOSKI *et al.*, 2002), assim como na área da ciência de alimentos para a extração de metais (BAĞDA; TÜZEN, 2017; FAN, Y. *et al.*, 2017; TUZEN *et al.*, 2018), e extração de compostos fenólicos os quais exercem atividade antioxidante (CAO, J. *et al.*, 2017; HUDDLESTON *et al.*, 1998; SUN; CHEN; SHI, 2014; VO DINH *et al.*, 2018).

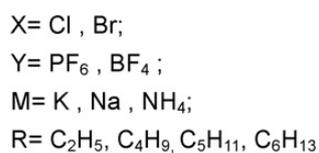
Além do disso, a eficiência de alguns LIs, como o cloreto de 1-butil-3metilimidazólio [BMIM][Cl] na extração de compostos bioativos, é devida a sua capacidade de dissolver a cadeia celulósica das matrizes vegetais como já relatado na literatura (BERTHOD; RUIZ-ÁNGEL; CARDA-BROCH, 2017; HUDDLESTON *et al.*, 1998; MARTINS, P.; ROSSO, 2014; NEMESTÓTHY *et al.*, 2017; VENTURA *et al.*, 2017). Os LIs baseados em imidazólio

apresentam estabilidade ao ar e água, e sendo assim, o uso desses para a extração de compostos bioativos em substituição potencial aos tradicionais VOS será discutido adiante.

### 4.3.3 Síntese de líquidos iônicos

A síntese tradicional dos LIs é laboriosa, demandando grande consumo de tempo, energia e reagentes orgânicos (BUBALO *et al.*, 2013). Pode ser realizada através de uma reação de alquilação dos haletos catiônicos imidazólio ou piridínio (quaternização direta), em um sistema de refluxo constante por 72 h em temperatura entre 70 a 80 °C. Em seguida para adição do ânion desejado (troca de íon) (Figura 7) é realizada uma reação de metátese (reação de dupla troca) (FANG *et al.*, 2007; SCHREKKER *et al.*, 2008; WASSERSCHIED; KEIM, 2000).

Figura 7 - Esquema de adição dos ânions para preparação dos LIs baseados em imidazólio.



Fonte: Fang et al. (2007).

A troca de ânions a partir de um LI formado por quaternização direta pode ser realizada com diversos compostos, assim como o tetrafluoroborato (BF<sub>4</sub>) e hexafluorofosfato (PF<sub>6</sub>), sendo estes importantes na determinação das propriedades físico-químicas dos LI, assim como a temperatura de fusão que é um importante parâmetro específico de cada LI (Tabela 2).

Tabela 2 - Diferentes ânions e sua influência no ponto de fusão de LIs baseados em sais de imidazólio.

LI baseados em sais de imidazólio	Ponto de fusão (°C)
[EMIM]Cl	87 <sup>a</sup>
[EMIM]NO <sub>2</sub>	55 <sup>a</sup>
[EMIM]NO <sub>3</sub>	38 <sup>a</sup>
[EMIM]AlCl <sub>4</sub>	7 <sup>a</sup>
[EMIM]CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub>	-9 <sup>a</sup>
[EMIM]CF <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	-14 <sup>a</sup>
[BMIM]PF <sub>6</sub>	10 <sup>b</sup>
[BMIM]BF <sub>4</sub>	-81 <sup>b</sup>

BMIM – 1-butil-3-metilimidazólio. EMIM – 1-ethyl-3-butylimidazólio. <sup>a</sup> Wasserscheid e Keim (2000), <sup>b</sup> Poole e Poole (2010).

Métodos alternativos de síntese de LIs vem sendo empregados, a principal estratégia é substituir o aquecimento convencional por métodos que promovam a energia de ativação necessária para a síntese desses solventes, porém esse aquecimento deve ser devidamente controlado, afim de não degradar os reagentes precursores (LIMA, 2011).

Nesse sentido, a utilização de equipamentos como o aquecimento por micro-ondas é uma alternativa ao processo tradicional de síntese. A radiação de micro-ondas é baseada em ondas de baixa frequência (entre 0,3 – 300 GHz), que são absorvidas pelo meio reacional e induzem a conversão em calor através da movimentação dos íons pela oscilação do campo eletromagnético (LIMA, 2011).

Porém, métodos de síntese de LI devem ser cuidadosamente avaliados e experimentalmente otimizados a fim de garantir um rendimento próximo ao método tradicional (em torno de 95 a 98 %). Nesse trabalho não serão avaliados métodos alternativos de síntese.

#### 4.3.4 Líquidos iônicos como solventes: legislações, obstáculos, limitações, efeito adversos e toxicidade

Inúmeros trabalhos concentram sua justificativa para o uso dos LIs principalmente no fato dos mesmos serem considerados substâncias atóxicas. O principal motivo dessa alegação justifica-se em função de que essas substâncias não possuem alta pressão de vapor, ou seja, sua taxa de volatilização em comparação com solvente orgânicos é muito menor, não havendo perdas por evaporação (LIMA, 2011; MEGAW *et al.*, 2015; WASSERSCHIED; KEIM, 2000). Por essa razão, LIs são uma excelente alternativa para a substituição dos VOS em processos de extração.

A Comissão Europeia (Diretiva 2009/32/EC) considera que para um solvente de extração ser usado para produção de produtos alimentícios, primeiro deve-se observar os requerimentos de saúde humana. Esses requerimentos devem também abordar a viabilidade econômica e técnica (European Commission). Além disso, um solvente para extração deve ser inteiramente ou pelo menos grande parte removido do produto final. Precisamente a Diretiva 2009/32/EC da Comissão Europeia lista os solventes de extração permitidos que podem ser usados no processamento de produtos crus, alimentos, componentes de alimentos e ingredientes de alimentos. Ainda, alguns desses solventes podem ser utilizados para uso geral, assim como propano, butano, acetato de etila, etanol, dióxido de carbono, acetona e óxido nitroso (EUROPEAN COMMISSION, 2009).

Solventes assim como hexano, acetato de metila, etilmetilcetona, diclorometano, metanol, propan-2-ol, éter dimetílico, e outros são usados para a produção de tipos alimentícios específicos, da produção de óleos e gorduras (hexano) até a produção de açúcar e a preparação de aromatizantes (acetato de metila), por exemplo (EUROPEAN COMMISSION, 2009).

A legislação da Comissão Europeia também estabelece os limites residuais no produto final, variando de 0,02 a 30 mg/kg para 1,1,1,2-tetrafluoroetano e hexano, respectivamente, em produtos específicos (EUROPEAN COMMISSION, 2009). A legislação brasileira, através da resolução RDC nº 466/2021, segue os mesmos padrões que a Comissão Europeia (ANVISA, 2021).

No Canadá, por exemplo, existe uma legislação que lista os solventes de extração ou de carregamento de compostos para serem usados em alimentos. Através da resolução SOR/2012-216, alguns solventes como acetona, álcool benzílico, acetato de etila, etanol, hexano, isopropanol, metanol e outros são permitidos para usos específicos relativos à taxa máxima de resíduo de até 2,2% para hexano em extrato de lúpulo, por exemplo (GOVERNMENT OF CANADA, 2016).

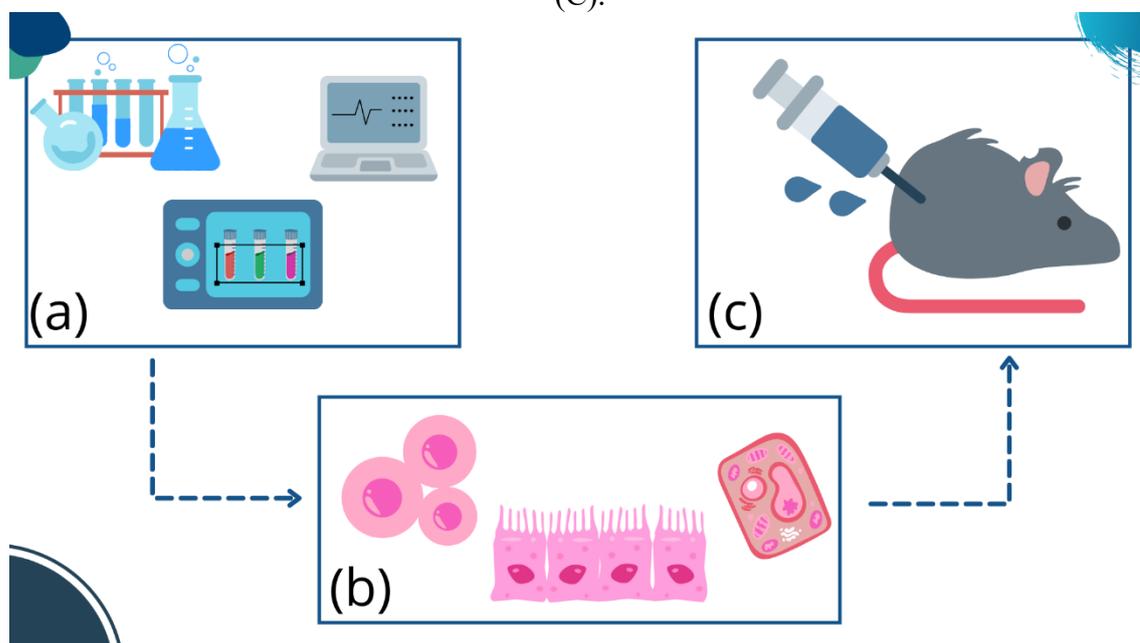
O FDA (*Food and Drug Administration*), através de Legislação Federais, estabelece uma série de aditivos secundários para aplicação direta em alimentos para a alimentação humana, incluindo vários solventes, assim como acetona, 1,3-butilenoglicol, acetato de etila, dicloreto de etileno, álcool isopropílico, álcool metílico, cloreto de metileno, hexano e tricloroetileno, com seus usos e limitações específicos (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2021). Entretanto, nenhuma informação de solventes de extração permitidos para alimentos, componentes ou ingredientes foi encontrada.

Atualmente o uso de LIs na indústria de alimentos, ou com vistas a aplicação humana é limitado. Agências regulamentadoras assim como FDA, *Codex Alimentarius* e a legislação da União Europeia ainda não regulamentaram o uso desses reagentes, pois existem estudos sendo conduzidos com o objetivo de avaliar possíveis danos à saúde do consumidor que possa utilizar ou consumir produtos que passaram por um procedimento industrial envolvendo o uso de LI (MARTINS, P. L. G.; BRAGA; DE ROSSO, 2017).

Assim, por mais que os LIs tenham se mostrado efetivos na extração de compostos bioativos de diferentes matrizes, sendo mais eficazes que água e VOS, o seu uso industrial em indústrias de alimentos vem sendo ignorado. É um fato que as diferentes legislações em diferentes países não possuem uma atualização considerando as novas descobertas relacionadas aos LIs. Dessa forma deve-se adotar alguns procedimentos para tentar enfrentar essa dificuldade: 1. Desenvolvimento pela indústria química farmacêutica de LIs grau alimentício, o que vai acarretar um desenvolvimento de conhecimento associado a sínteses orgânicas (engenharia de ligações iônicas, por exemplo), métodos analíticos (adequação de métodos de NMR e MS) e farmacologia (para garantir que novos LIs sejam seguros e não tenham interação negativa com células e órgãos humanos); 2. As atuais legislações pertinentes devem ser atualizadas considerando a extração de extratos ricos em compostos bioativos obtidos com LIs (SHAMSHINA *et al.*, 2015).

Considerando esses aspectos, o uso de LIs em aplicações alimentícias pode se tornar uma realidade em breve. Para garantir segurança toxicológica dos LIs e dos extratos obtidos com esses solventes, devem ser considerados os pontos demonstrados na Figura 8, que sugere os passos a serem tomados para uma investigação toxicológica preliminar. Após a síntese dos LIs e obtenção dos extratos bioativos, métodos *in vitro* devem ser conduzidos usando reações químicas e enzimáticas, seguido por testes *in vitro* usando diferentes culturas celulares de origem humana, de diferentes órgãos e de tecidos que reproduzem as estruturas e funções (organoides) correspondentes ao *in vivo*, e finalmente análises *in vivo* usando diferentes modelos animais. Essa abordagem ampla e multidisciplinar é necessária não apenas para garantir a segurança toxicológica, mas também para avaliar quaisquer interações prejudiciais com células/órgãos, biodisponibilidade e bioatividade dos extratos obtidos com LIs.

Figura 8 - Passos sugeridos para a investigação toxicológica de extratos obtidos com LIs. Testes *in vitro* (A), testes *in vitro* baseados em linhagens celulares e órgãos (B) e testes *in vivo* (C).



Fonte: autor

Considerando que podem existir diversas combinações entre cátions e ânions para a formação dos LIs, é uma grande generalização considerarmos todos como substâncias atóxicas. Ao mesmo passo que existem estudos indicando a biodegradação de alguns LIs, existem estudos indicando baixa ou incompleta taxa de bioeliminação dos mesmos, que mostram-se tóxicos tanto quanto alguns solventes (MEGAW *et al.*, 2015).

Outro fator crucial é a sorção dos LIs em solos e sedimentos, por serem compostos geralmente com cadeias curtas ou poucos grupos hidroxil, estes têm maior mobilidade, podendo impregnar e contaminar superfícies e águas subterrâneas. Esses dois fatores, sua baixa ou incompleta eliminação e seu potencial em impregnar em superfícies podem acarretar no acúmulo desses reagentes no ambiente, poluindo-o (MEGAW *et al.*, 2015).

Dessa maneira, mais importante que generalizar todos os LIs como substâncias tóxicas ou não tóxicas, é avaliar cada caso em específico, cada tipo de LI em sua concentração em particular, voltado a um propósito específico. Nesse sentido, na Tabela 3 estão apresentados diferentes estudos avaliando a toxicidade de diferentes LIs.

Tabela 3 - Trabalhos investigando a citotoxicidade de LIs em modelos celulares e animais.

Referências	LIs testados	Células/animais testados	Métodos
Hwang et al. (2018)	[EMIM][TFSI], [EMIM][PF <sub>6</sub> ], [EMIM][BF <sub>4</sub> ], [EMIM][DCA], [BMPY][TFSI], [TBA][TFSI], [Zn][TFSI] (0.2 a 10 mmol L <sup>-1</sup> ).	Células HaCAT e Hs68 (queratinócitos).	MTT <sup>a</sup> .
Megaw et al. (2015)	([C <sub>2</sub> MIM][Cl] 200 mg ml <sup>-1</sup> ), ([C <sub>4</sub> MIM][Cl], [C <sub>6</sub> MIM][Cl], [C <sub>8</sub> MIM][Cl], [C <sub>10</sub> MIM][Cl], [C <sub>12</sub> MIM][Cl] 100 mg ml <sup>-1</sup> ), e ([C <sub>14</sub> MIM][Cl], [C <sub>16</sub> MIM][Cl], [C <sub>18</sub> MIM][Cl] 50 mg ml <sup>-1</sup> ).	Larva ( <i>Galleria mellonella</i> ).	LD <sub>50</sub> <sup>b</sup> .
Thamke e Kodam (2016)	[BMIM][Br] (0, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 mg L <sup>-1</sup> ).	Peixe ( <i>Poecilia reticulata</i> ).	Atividades de CAT, SOD e GST <sup>c</sup> .
Zhang et al. (2017)	[C <sub>2</sub> MIM][NO <sub>3</sub> ] 1000 a 4000 mg L <sup>-1</sup> , [C <sub>4</sub> MIM][NO <sub>3</sub> ] 400 a 1200 mg L <sup>-1</sup> , [C <sub>6</sub> MIM][NO <sub>3</sub> ] 50 a 200 mg L <sup>-1</sup> , [C <sub>8</sub> MIM][NO <sub>3</sub> ] 5 a 100 mg L <sup>-1</sup> , [C <sub>10</sub> MIM][NO <sub>3</sub> ] 0.5 a 20 mg L <sup>-1</sup> , [C <sub>12</sub> MIM][NO <sub>3</sub> ] 0.5 a 7 mg L <sup>-1</sup> , [C <sub>6</sub> MIM][Cl] 50 a 200 mg L <sup>-1</sup> , [C <sub>6</sub> MIM][Br] 100 a 250 mg L <sup>-1</sup> , [C <sub>6</sub> MIM][BF <sub>4</sub> ] 50 a 200 mg L <sup>-1</sup> e [C <sub>6</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ] 50 a 250 mg L <sup>-1</sup> .	Peixe-zebra ( <i>Danio rerio</i> ).	LC <sub>50</sub> <sup>d</sup> .
Larangeira et al. (2016)	[BMIM][Cl] puro.	Ratos Wistar.	Avaliação histopatológica do fígado e rins; ensaio celular; MNT; imunquímica.
Chen et al. (2014)	[BMIM][Cl], [OMIM][Cl], [BMIM][PF <sub>6</sub> ], [OMIM][PF <sub>6</sub> ], [EMIM][Br], [BMIM][FeCl <sub>4</sub> ], [BMIM][I], [BMIM][NTf <sub>2</sub> ], [EMIM][BF <sub>4</sub> ], [BMIM][BF <sub>4</sub> ], [OMIM][BF <sub>4</sub> ], C <sub>4</sub> Cl, C <sub>6</sub> Cl, C <sub>8</sub> Cl, C <sub>4</sub> Br, C <sub>6</sub> Br, C <sub>9</sub> Br, C <sub>6</sub> NTf <sub>2</sub> , C <sub>9</sub> NTf <sub>2</sub> , C <sub>9</sub> (Vim) <sub>2</sub> (NTf <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> , C <sub>12</sub> NTf <sub>2</sub> – entre 0.0056 a 111.569 mmol L <sup>-1</sup> .	Células A549 (carcinoma humano).	CCK-8, WST-8 <sup>f</sup> para expressar o EC <sub>50</sub> <sup>g</sup> .

<sup>a</sup>MTT: Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). <sup>b</sup>Dose letal média. Enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona S-transferase (GST). <sup>d</sup>Concentração letal média. <sup>e</sup>Teste de micronúcleo. <sup>f</sup>Kit de contagem celular (Kit-8) e sal monossódico de 2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-dissulfonil)-2H-tetrazólio. <sup>g</sup>Concentração efetiva.

De acordo com Hwang et al., (2018) existem trabalhos avaliando os efeitos de LI em células HeLa, CaCo-2, MCF7 e PC12. Hwang et al. (2018) avaliaram a toxicidade dermal, pois a pele é um órgão diretamente exposto a substâncias químicas, de 7 LI células HaCaT (queratinócitos) e Hs68 (fibroblastos), utilizando o método MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). O LI composto pelo ânion [TFSI] (independente da concentração) apresentou toxicidade em relação aos demais LIs analisados, principalmente nas células HaCaT, podendo ser comparado a toxicidade do LI, nas mesmas concentrações, relativo ao solvente orgânico xileno (10 mmol/L). O tratamento com o LI [BMPY][TFSI] (0,5, 1 e 2

mmol/l) em células HaCaT induziram a morte celular via necrose, sugerindo que a toxicidade dermal dos LIs está associada ao ânion utilizado em sua composição.

Megaw et al. (2015) verificaram a toxicidade de nove LIs em *G. mellonella*. Essa larva apresenta um sistema imunológico análogo a resposta do sistema imune mamífero, sendo suscetível a diversas patologias humanas. Os experimentos foram realizados aplicando diferentes soluções de LIs nos animais, contra um grupo controle (tratados com água estéril) Tabela 3. As larvas foram então incubadas por até 24 h a 30 °C e consideradas mortas se imóveis ou falhando a reorientação e estímulos. De acordo com a resposta de dose letal (LD50), foi observado que o aumento da cadeia alquila dos LIs pode reduzir a resistência das larvas. Entretanto, há uma relação direta entre o aumento do número de carbonos na cadeia alquila com a toxicidade (LD50 ug g<sup>-1</sup>: [C2] 7538,5; [C4] 91,3; [C6] 20,1; [C8] 11,7 ug g<sup>-1</sup>).

Thamke e Kodam (2016), avaliaram o efeito da toxicidade de diferentes concentrações do LI [BMIM][Br] em peixes (*Poecilia reticulata*) por 24, 48, 72 e 96 (Tabela 3). Os peixes foram sacrificados, e seus fígados (responsáveis pela eliminação de substâncias tóxicas) foram usados para avaliar a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST) que são biomarcadores de poluição para organismos aquáticos. Resumidamente, as atividades de SOD e CAT aumentaram até 50 mg L<sup>-1</sup> de [BMIM][Br], indicando a formação de produtos oxidativos e sugerindo dano celular. A 100 mg L<sup>-1</sup>, mais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi acumulado nas células, diminuindo a atividade de SOD e CAT. Além disso, o GST é responsável pela desintoxicação e proteção dos tecidos do estresse oxidativo. Foi observado aumento da GST em relação à concentração de [BMIM][Br], sugerindo que a exposição a este LI promove estresse oxidativo celular.

No mesmo trabalho, os autores tinham como objetivo secundário identificar uma bactéria que pudesse bioprocessar os resíduos desse LI, reduzindo sua toxicidade. Os resultados sugeriram que a cepa *Rhodococcus hoagii* VRT1 após oito dias reduziu em 58% e 60% a demanda biológica de oxigênio e a demanda química de oxigênio, respectivamente. Isso pode estar associado à degradação do LI [BMIM][Br]. A conclusão dos autores enfatiza que os LIs podem ser tóxicos para a fauna e flora aquática em determinadas circunstâncias e concentrações (THAMKE; KODAM, 2016).

Zhang et al. (2017) usaram o peixe-zebra como bioindicador, uma vez que os LIs podem se infiltrar e causar poluição do solo e da água, para testar os efeitos tóxicos de dez LIs com diferentes ânions e comprimentos de cadeia alquila (Tabela 3). A  $LC_{50}$  (concentração letal média) foi usada para avaliar a concentração de cada LI. Cada LI teve uma consequência na sobrevivência dos peixes-zebra em até 96 h de exposição. De acordo com a classificação de risco, os autores classificaram os LIs usando a  $LC_{50}$  da seguinte forma: relativamente inofensivo ( $[C_2MIM][NO_3]$ ,  $LC_{50}^{96h}$  3193,5 mg L<sup>-1</sup>), praticamente inofensivo ( $[C_4MIM][NO_3]$ ,  $[C_6MIM][NO_3]$ ,  $[C_6MIM][Br]$ ,  $[C_6MIM][Cl]$ ,  $[C_6MIM][BF_4]$ ,  $[C_6MIM][PF_6]$ ,  $LC_{50}^{96h}$  entre 120,1 e 867,1 mg L<sup>-1</sup>), ligeiramente tóxico ( $[C_8MIM][NO_3]$   $LC_{50}^{96h}$  23,1 mg L<sup>-1</sup>) e moderadamente tóxico ( $[C_{10}MIM][NO_3]$  e  $[C_{12}MIM][NO_3]$   $LC_{50}^{96h}$  4,5 e 3,7 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente) concluindo que o efeito tóxico pode ser intensificado aumentando o comprimento da cadeia alquil.

Por outro lado, existem autores que reportam a utilização de alguns LIs em condições que não oferecem toxicidade. Lorangeira et al. (2016) avaliaram os efeitos adversos do LI cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio  $[BMIM][Cl]$  (puro, fornecido em 500 mg/kg/7dias) em ratos Wistar (Tabela 3). Através de histopatologia (avaliação em microscópio), seguindo uma escala semi-quantitativa crescente de dano de 1 a 3, concluíram que o solvente não foi capaz de induzir mudanças nos rins dos animais avaliados, porém no fígado o LI causou mudanças moderadas. Ao avaliar o fígado por imunocímica o LI  $[BMIM][Cl]$  não foi capaz de causar danos ao DNA, de acordo com os níveis de 8-OHdG (biomarcador de dano ao DNA).

Os autores também fizeram a extração de carotenoides de amostras de tomate utilizando o mesmo LI, e após a sua remoção por cristalização em baixa temperatura, avaliaram seu efeito *in vivo* e concluíram em geral que a dose recomendada de carotenoides (5 mg/kg/dia) para consumo humano extraído com LI não induz a genotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade em órgão de ratos (LARANJEIRA *et al.*, 2016).

Chen et al. (2014) avaliaram os efeitos de 21 LIs baseados em imidazólio em células de pulmão humanas (Tabela 3). Após avaliação colorimétrica nas células incubadas por 0, 3, 6, 24 e 48 h (utilizando os kits de contagem celular Kit-8 (CCK-8), WST-8 ((2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-dissulfofen-il)-2H-tetrazólio sal monossódico)), os autores concluíram que a toxicidade está relacionada com a cadeia alquila de cada LI, ou seja, com o aumento do número de carbonos da cadeia lateral, a toxicidade aumenta (considerando um mesmo ânion), e que alguns LIs dependendo de seu tipo e concentração assim como o  $C_{12}NTf_2$ , que apresentou  $EC_{50}$  na concentração de 0,0056 mmol/L, apresentam toxicidade ao organismo humano. É conhecido que LIs com cadeias alquilas longas apresentam uma toxicidade mais

pronunciada em relação aos com menor cadeia alquila, considerando um LI com mesmo ânion (CHEN, H.-L. *et al.*, 2014; MEGAW *et al.*, 2015; ZHANG, C. *et al.*, 2017).

Considerando o uso de culturas celulares em relação a teste em animais, estas apresentam algumas vantagens. A variedade de tipos de células de diferentes tecidos, vários métodos de análise desenvolvidos para células, a possibilidade de investigar a proliferação celular, a possibilidade de investigar doses subletais e letais e até a recuperação das células após um tratamento e, obviamente, sem necessidade de utilizar animais são as principais vantagens. Além disso, as células humanas representam melhor as características do sistema humano em relação aos modelos animais (COMBES, 2004).

Por outro lado, existem poucas desvantagens em usar culturas de células para avaliação de toxicidade. Testar substâncias para avaliar seus efeitos tóxicos nas células pode extrapolar as condições naturais, uma vez que os testes *in vitro* não consideram os processos biológicos, como absorção, distribuição, metabolismo e vias metabólicas. Além disso, sistemas biológicos essenciais, por exemplo, sistema imunológico, de transporte, endócrino e nervoso, assim como barreiras biológicas, como a pele, não são considerados (COMBES, 2004). Estas são algumas limitações desta categoria de análises.

Dessa maneira, o estudo de LIs voltado à utilização em processos que envolvam alimentos para consumo humano deve ser avaliado sob critérios rigorosos para o estabelecimento da segurança para a saúde. Para a utilização de um LI em um processo de extração por exemplo, é importante primeiramente realizar sua remoção, e avaliar as doses residuais, bem como a sua toxicidade em células humanas ou em modelos animais, a fim de verificar em qual concentração o LI pode ser prejudicial à saúde, levando em consideração sua aplicação e como será o seu uso ao consumidor final (ingestão, aspersão, por contato, entre outras).

#### **4.3.5 Aplicação de LIs como solvente alternativo para a extração de composto bioativos**

Em geral compostos bioativos incluindo vitaminas, compostos fenólicos, ácidos graxos essenciais, substâncias aromáticas e flavorizantes apresentam baixa solubilidade em água (CHANDRASEKARA; SHAHIDI, 2018; REZAEI; FATHI; JAFARI, 2019). A solubilidade desses compostos está relacionada ao solvente extrator, que é capaz de manter o soluto através de forças atrativas intermoleculares, e por esta razão é que os compostos

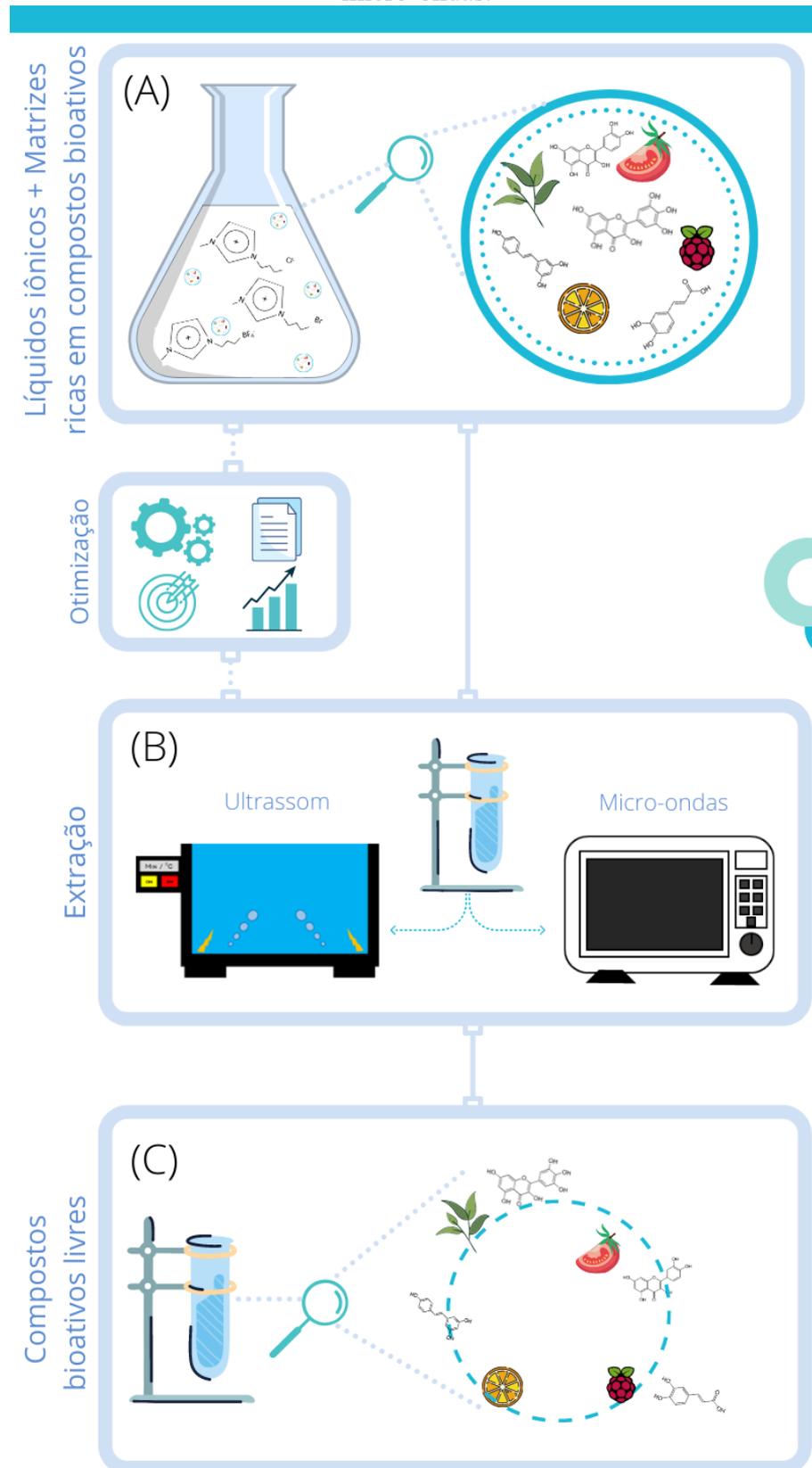
bioativos são majoritariamente extraídos utilizando solventes orgânicos (RECHARLA *et al.*, 2017; REZAEI; FATHI; JAFARI, 2019).

Portanto, estudos envolvendo métodos alternativos para extração utilizando solventes inovadores são uma tendência nessa área de pesquisa. Nesse sentido, alguns autores utilizam LIs como solvente substituto aos solventes orgânicos tradicionais.

Existem poucos estudos utilizando LIs como solventes extratores de compostos bioativos. Os trabalhos disponíveis utilizam métodos simples para a obtenção de diferentes classes de compostos bioativos, assim como a micro extração em fase sólida e principalmente as extrações assistidas por ultrassom e micro-ondas. A Figura 9 apresenta um esquema de extração comum para a obtenção de compostos bioativos.

Resumidamente, LIs (variando a concentração e tipo) e a matriz rica em compostos bioativos (Figura 9A) são misturados de acordo com o propósito de pesquisa. Nesta forma inicial, os compostos bioativos podem estar ligados a outros constituintes da matriz, por exemplo, os compostos fenólicos podem estar ligados a celulose, hemicelulose, lignina, pectina e proteínas (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014). Por esse motivo, a próxima etapa (Figura 9B) é submeter a solução a um sistema de extração, como ultrassom ou micro-ondas, para promover uma condição de extração. Frequentemente nesta etapa, há uma otimização nos parâmetros dos equipamentos, como temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), potência (W), frequência (Hz), agitação e tempo (min); e no ambiente de extração, como tipo do LI e concentração ( $\text{mol L}^{-1}$ ), relação sólido-líquido ( $\text{g L}^{-1}$ ) e tamanho de partícula ( $\text{\AA}$ ), com o objetivo de maximizar a recuperação dos compostos de interesse. Por fim, é realizada a extração, liberando os compostos bioativos de interesse (Figura 9C).

Figura 9 - Esquema de extração de compostos bioativos usando LIs assistido por ultrassom ou micro-ondas.



Um dos grupos mais estudado dentro dos compostos bioativos são os compostos fenólicos (CF). Os CF são metabólitos secundários produzidos pelos tecidos vegetais em condições de estresse, assim como: mudanças climáticas, condições desfavoráveis de luz, ataques biológicos, lesões físicas, entre outros. O grupo abrange flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, estilbenos, cumarinas e lignanas. CF podem eliminar espécies reativas de oxigênio, agindo como compostos antioxidantes, entretanto apresentam baixa solubilidade em água (LIU *et al.*, 2019; REZAEI; FATHI; JAFARI, 2019). É nesse sentido que solventes alternativos como os LIs são atualmente uma tendência nesse campo de estudo.

Cao *et al.* (2017) descreveram um método de micro extração em fase sólida dispersiva para obtenção de compostos fenólicos da própolis, baseados na avaliação de 5 diferentes LIs da classe 1-dodecil-3-metilimidazólio ([C<sub>12</sub>MIM]Cl, [C<sub>12</sub>MIM]Br, [C<sub>12</sub>MIM]SO<sub>3</sub>, [C<sub>12</sub>MIM]HSO<sub>3</sub> e [C<sub>12</sub>MIM]NO<sub>3</sub>). O uso do LI foi capaz de extrair 20 compostos fenólicos identificados por UHPLC-Q-TOF/MS, sendo o brometo de 1-dodecil-3metilimidazólio [C<sub>12</sub>mim][Br] a 200 mM o melhor extrator entre os LIs avaliados (Tabela 4). A extração foi efetiva principalmente pela ação do ânion Br<sup>-</sup> e pela longa cadeia carbônica, fatores que contribuíram para a extração dos compostos fenólicos de interesse. É interessante destacar que o método proposto utilizou somente 0,1 mL de VOS (acetato de etila para eluir os compostos após a extração em fase sólida), diminuindo assim a geração de resíduos e potencial poluição.

Além disso, o método proposto pelos autores apresentou uma alta sensibilidade excelente precisão, boa exatidão e níveis baixos de limite de detecção (LOD). O método se mostrou simples, rápido, eficiente e exigiu uma baixa quantidade de VOS comparado ao método tradicional (CAO *et al.*, 2017).

Santos *et al.* (2021) investigaram a extração de flavonoides da própolis vermelha. Foi avaliada uma extração de triagem com quatro tipos de LIs usando várias combinações junto com cossolventes (água e etanol) (Tabela 4). Os resultados otimizados indicaram uma extração efetiva de flavonoides usando uma solução de [C<sub>6</sub>MIM][Cl] com água (10:1). Em comparação com a extração tradicional utilizando etanol 70 e 95% (112,93 e 275,85 mg de rutina g<sup>-1</sup>, respectivamente), a condição de extração otimizada usando LI foi aproximadamente de 4,1 e 1,7 vezes (470,96 mg de rutina g<sup>-1</sup>) superior, respectivamente, à abordagem tradicional. Além disso, os autores relataram um efeito positivo na atividade antimicrobiana do LI [C<sub>6</sub>MIM][Cl] contra *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus*, indicando que o LI interage com componentes celulares da parede microbiana, sugerindo a necessidade do desenvolvimento de estudos de toxicidade em células humanas.

A extração de ligninas de frutas, assim como a Magnólia chinesa (*Schisandra chinensis*) utilizando LI foi descrita por Ma et al. (2011). Para a extração tradicional desses compostos são utilizados VOS (etanol, éter dietílico, éter de petróleo, clorofórmio e metanol) por um longo período, demandando grande consumo de energia. Como método alternativo, foram avaliados diferentes LIs baseados em metilimidazólio, variando o tamanho da cadeia carbônica (C<sub>2</sub> até C<sub>12</sub>) e também o tipo de ânion (Br, BF<sub>4</sub>, HSO<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub>, ClO<sub>4</sub>, OH e Ac) para a extração desses compostos (Tabela 4). Com o aumento da cadeia carbônica e mantendo o ânion Br, ocorreu um aumento na eficiência de extração de ligninas de  $11,9 \pm 0,3$  para  $100 \pm 3,4\%$  em geral, concluindo que o LI é um excelente extrator de compostos vegetais, assim como as ligninas. Comparado ao método tradicional de extração com etanol, o uso de LI aumentou aproximadamente 3,5 vezes a eficiência de extração, com redução de tempo de 6h para 30 min. O trabalho também não apresenta informações relacionadas a remoção do LI do extrato obtido (MA et al., 2011).

A extração assistida por micro-ondas dos flavonóis miricetina e quercetina das folhas da amora chinesa (*Myrica rubra*) utilizando soluções aquosas de brometo de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][Br] 2,5 mol L<sup>-1</sup> e sulfato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][HSO<sub>4</sub>] 2,0 mol L<sup>-1</sup> foi descrita por Du, Xiao e Li (2011) (Tabela 4). O rendimento da extração dos flavonóis miricetina e quercetina em relação à metodologia de extração com LI (sem o uso de VOS) foi, respectivamente, 2,7% e 18% superior ao método tradicional com etanol 95%. Além disso, a extração assistida por micro-ondas aumentou o rendimento dos extratos de LI em 26% para a miricetina e 49% para a quercetina. Portanto, esses resultados estão associados à combinação da extração por LI+micro-ondas.

Du, Xiao e Li (2007), utilizando um planejamento 3<sup>4</sup> (tamanho da amostra, razão amostra/solvente, tempo e temperatura de extração), otimizaram um processo de extração com LI assistido por micro-ondas de *trans*-resveratrol, conhecido por seu efeito antibacteriano, hepato protetivo e antitumoral. A recuperação do *trans*-resveratrol utilizando solução aquosa do LI [BMIM][Br] 2,5 mol L<sup>-1</sup> como solvente, atingiu um rendimento de cerca de 92,8%, enquanto com metanol foi de 88%. Além disso, o método proposto reduziu pelo menos 50% da relação sólido/líquido e redução de 60 min para 10 min de extração (Tabela 4).

Para aumentar o potencial de extração dos LIs, Lou et al. (2012) combinaram a extração simultânea assistida por micro-ondas e ultrassom de ácido cafeico, quercetina e ácido clorogênico de folhas de bardana (*Arctium lappa* L). Para isso, os autores utilizaram uma série de LIs à base de 1-butil-3-metilimidazólio, com diferentes ânions (Cl, Br, BF<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). O LI [BMIM][Br], 1,5 mol L<sup>-1</sup> em solução aquosa, foi utilizado para extrair os compostos

polifenólicos por um equipamento de ultrassom/micro-ondas (400 W e 30 s de extração) (Tabela 4). Comparado à extração convencional por aquecimento em refluxo usando etanol 70%, o método proposto aumentou o rendimento da extração em cerca de 7% para ácido clorogênico e cafeico, e 15% para quercetina, e reduziu o tempo de extração de 5 h para 30 s. Dessa forma, a técnica utilizada mostrou-se rápida e inovadora.

Outra classe de compostos bioativos são os alcaloides. Esses compostos possuem atividade biológica relacionada ao potencial antimicrobiano e analgésico, reduzindo também os níveis de colesterol. Foi desenvolvido um método utilizando LI assistido por micro-ondas para a extração de três alcaloides (N-nornuciferina, O-nornuciferina e nornuciferina) da folha de lótus (*Nelumbo nucifera*), sendo a principal contribuição da nornuciferina sua atividade anti-HIV. Os autores testaram sete LIs à base de 1-alkuil-3-metilimidazólio (alterando as frações catiônicas e aniônicas). O método proposto, comparado ao método tradicional com etanol 95%, aumentou a extração da N- nornuciferina e nornuciferina em 15% e 3% respectivamente. O método também alcançou eficiências de 43,7% em relação aos métodos tradicionais testados e redução do tempo de extração de 2 h para 2 min, usando solução aquosa de brometo de 1-hexil-3-metilimidazólio [C<sub>6</sub>MIM][Br] 1,0 mol L<sup>-1</sup> como solvente (Tabela 4) (MA *et al.*, 2010).

Outro estudo com alcaloides, onde Cao et al. (2009) utilizaram uma solução aquosa de tetrafluoroborato de 1-alkuil-3-metilimidazólio [C<sub>4</sub>MIM][BF<sub>4</sub>] 2 mol L<sup>-1</sup> assistida por ultrassom para extrair piperina, um alcalóide obtido da pimenta branca (*Piper nigrum L.*) com ação antifúngica e anti-inflamatória. Os resultados indicaram que o método reduziu o processo de extração de 2 h para 30 min, com um aumento de 45 % em relação ao método tradicional (refluxo com metanol 75%) (Tabela 4). Nos trabalhos de Cao et al. (2017); Cao et al. (2009); Du, Xiao e Li (2007, 2011); Lou et al. (2012); Ma et al (2011); Ma et al (2010); Santos et al. (2021), não foram mencionadas informações sobre a remoção do LI dos extratos.

Os pigmentos naturais assim como os carotenoides fazem parte dos compostos bioativos lipossolúveis, demonstrando atividade de pró-vitamina A ( $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina) (ROSTAMABADI; FALSAFI; JAFARI, 2019). Martins e De Rosso (2016) sintetizaram o LI cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][Cl] e hexafluorofostato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][PF<sub>6</sub>] para extrair e então avaliar a estabilidade (térmica e a luz) e a atividade antioxidante de carotenoides extraídos de tomates. O trabalho focou na obtenção do pigmento pela extração assistida em ultrassom visando aplicação na indústria de alimentos. Os carotenoides obtidos com LI mostraram-se estáveis, porém o rendimento de extração e atividade antioxidante se mostraram menor em relação ao método tradicional

utilizando acetona (Tabela 4). Nesse trabalho, o LI foi removido e recuperado do extrato final através de cristalização utilizando baixas temperaturas, assim sendo, o LI pode ser reutilizado.

Outro estudo com carotenoides avaliou a capacidade de vários LIs em extrair esse composto bioativo da casca de laranja. Murador et al. (2019) desenvolveram um método usando o LI [BMIM][Cl] e etanol como cossolvente (1:2, respectivamente) assistido por ultrassom de sonda de para recuperar os carotenoides da casca de laranja (Tabela 4). Os parâmetros de extração foram avaliados por meio de um planejamento fatorial fracionário para triagem e um planejamento composto central para a otimização. Foram avaliadas as proporções de LI1/LI2 (estudaram quatro LIs diferentes), relação sólido-líquido, ciclos de extrações, tempo de extração e relação IL/cossolvente. O método otimizado aumentou quatro vezes a extração de carotenoides totais de  $7,88 \mu\text{g g}^{-1}$  (método convencional com acetona) para  $32,08 \mu\text{g g}^{-1}$ , e a atividade antioxidante do método com LI foi de  $24,67 \mu\text{mol } \alpha\text{-tocoferol equivalentes g}^{-1}$  de amostra seca ao contrário de  $12,42 \mu\text{mol } \alpha\text{-tocoferol equivalentes g}^{-1}$  para o método tradicional usando acetona. Além disso, os autores usaram apenas 6 ciclos de 5 min de extração. O contrário da extração exaustiva utilizada na metodologia tradicional para recuperação de carotenoides. Neste trabalho, foi realizada a remoção do LI do extrato final utilizando resina XAD-7HP, permitindo a recuperação do IL.

Mesquita et al. (2019) avaliaram a extração de carotenoides de frutas (*Bactris gasipaes*). Um processo de otimização avaliou quatro tipos de LIs, sendo [C<sub>4</sub>MIM][BF<sub>4</sub>] o mais eficaz no processo de extração de carotenoides. Ao usar o método de extração com LI+etanol assistido por ultrassom, a resposta média de  $171,7 \mu\text{g carotenoides g}^{-1}$ , mostrou-se cerca de 1,9 vezes mais eficiente do que o método tradicional usando acetona ( $88 \mu\text{g carotenoides g}^{-1}$ ). Além disso, os autores concluíram que reciclando o LI, removendo-o do extrato usando baixa temperatura ( $-80 \text{ }^\circ\text{C} / 70 \text{ min}$ ), a pegada de carbono (*carbon footprint*) foi reduzida em 50% em comparação com a metodologia tradicional de extração de carotenoides.

Kou et al. (2018) utilizaram extração assistida por ultrassom com LI para obtenção simultânea de gingeróis (compostos bioativos lipofílicos com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e anticâncer) e polissacarídeos bioativos (compostos com propriedades antioxidantes e anti-fadiga) presentes no gengibre. Foram utilizados vários LIs baseados em metilimidazólio em diferentes concentrações ( $0,2$  a  $2 \text{ mol L}^{-1}$ ), variando a fração catiônica (C<sub>2</sub> a C<sub>5</sub>) e aniônica (Cl, Br, BF<sub>4</sub> e HSO<sub>4</sub>) para a extração em ultrassom (Tabela 4). Comparado com a extração tradicional usando água e etanol 95% por 480 min, a extração assistida por ultrassom usando solução aquosa de [C<sub>4</sub>MIM][BF<sub>4</sub>] aumentou em 19% a recuperação desses compostos, particularmente altos níveis de gingeróis foram extraídos,.

Porém, o método proposto não foi eficiente na extração de polissacarídeos bioativos, reduzindo em 7% o rendimento em relação à abordagem convencional. Entretanto, o método proposto economizou cerca de 70% de energia para extração de gíngerois em comparação com a metodologia convencional. Neste trabalho, a remoção do LI do extrato final foi realizada utilizando resina macroporosa D101, permitindo a recuperação do LI.

Nos trabalhos de Kou et al. (2018), Martins e Rosso (2016), Mesquita et al. (2019) e Murador et al. (2019) foram utilizadas técnicas para a separação do LI investigado do extrato bioativo obtido. Os procedimentos de remoção empregados foram baseados na cristalização em baixa temperatura e na separação física utilizando resinas específicas. Para possíveis aplicações do extrato obtido em produtos alimentícios, é importante a avaliação do teor residual de LI, sendo determinado principalmente por técnicas analíticas como a cromatografia líquida de alta eficiência.

Assim como exposto no item 4.3.4, a avaliação da segurança toxicológica para aplicação dos LIs é um fator importante para sua utilização em larga escala pela indústria de alimentos, e sendo assim, os níveis residuais de LI nos extratos tornam-se fundamental.

Tabela 4 - Estudos sobre a extração de compostos bioativos utilizando LIs.

Referência	Amostra	LIs testados	Método de extração	Condições de extração	Compostos bioativos extraídos
Cao et al. (2017).	Própolis.	[C <sub>12</sub> MIM][Cl], [C <sub>12</sub> MIM][Br], [C <sub>12</sub> MIM][SO <sub>3</sub> ], [C <sub>12</sub> MIM][HSO <sub>3</sub> ] e [C <sub>12</sub> MIM][NO <sub>3</sub> ].	Ultrassom (US) e extração dispersiva em fase sólida.	1g de própolis; 20 mL de solvente; potência do US, 300 W; tempo, 20 min; temperatura, 25 °C; IL [C <sub>12</sub> MIM][Br] 200 mmol L <sup>-1</sup> (aquoso); agitação 60 s; 3 mg mL <sup>-1</sup> de celulose microcristalina (sorbente); solvente de eluição, metanol.	Ácido cafeico, escopoletina, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, metil éster de ácido cumárico, quercetina, pinobanksin-5-metil éter, quercetina-7-metil éter, pinobanksin, kaempferol, quercetina-3-metil éter, apigenina, quercetina-dimetil-éter, pinobanksin-3-o-acetato, crisina-5-metil-eter, pinocembrina, galangina-5-metil éter, ácido cafeico fenil etil éster, crisina e galangina
Santos et al. (2021).	Própolis.	[C <sub>6</sub> MIM][Cl], [C <sub>4</sub> MIM][Cl], [C <sub>6</sub> MIM][PF <sub>4</sub> ] [C <sub>4</sub> MIM][BF <sub>4</sub> ].	Ultrassom. e	Razão sólido/líquido, 1:3; ciclos de extração, 4; potência do US, 300 W; tempo, 3,3 min; LI [C <sub>6</sub> MIM][Cl] 10:1 com água; extração em banho de gelo.	Flavonoides.

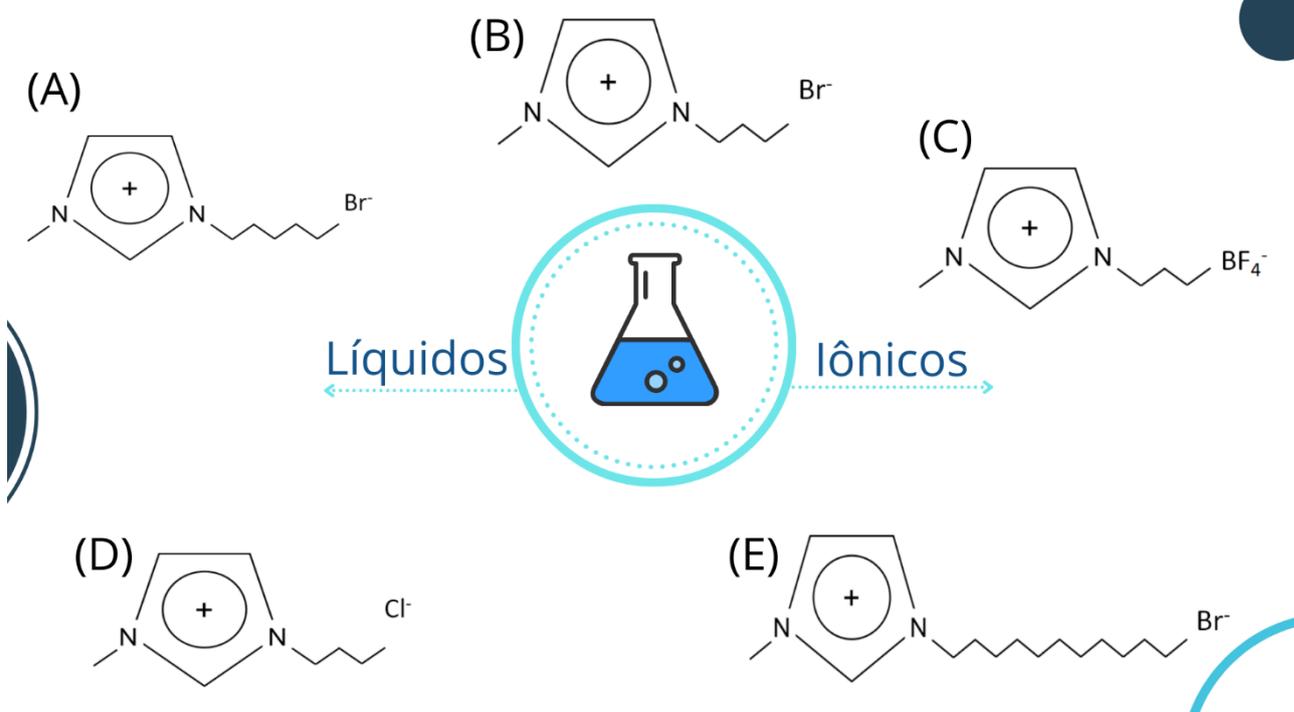
Referência	Amostra	LIs testados	Método de extração	Condições de extração	Compostos bioativos extraídos
Ma et al. (2011).	Fruta ( <i>Schisandra chinensis</i> Baill).	[C <sub>4</sub> MIM][NO <sub>3</sub> ], [C <sub>4</sub> MIM][HSO <sub>4</sub> ], [C <sub>4</sub> MIM][ClO <sub>4</sub> ], [C <sub>4</sub> MIM][OH], [C <sub>4</sub> MIM][Ac], [C <sub>4</sub> MIM][Br] e [C <sub>4</sub> MIM]BF <sub>4</sub> . Também vários comprimentos da cadeia alquila foram testados: [C <sub>2</sub> MIM][Br], [C <sub>4</sub> MIM][Br], [C <sub>6</sub> MIM][Br], [C <sub>8</sub> MIM][Br], [C <sub>10</sub> MIM][Br] e [C <sub>12</sub> MIM][Br].	Ultrassom.	Razão sólido/líquido, 1:12; ciclos de extração, 3; potência do US, 200 W; tempo, 30 min; LI [C <sub>12</sub> MIM][Br] 0,8 mol L <sup>-1</sup> (aquoso); temperatura não disponível.	Ligninas: esquizandrina, esquizandrina A, deo esquizandrina, e $\gamma$ -esquizandrina.
Du, Xiao and Li, (2011).	Folhas ( <i>Myrica rubra</i> ).	[BMIM][Cl], [BMIM][Br], [EMIM][Br], [HMIM][Br], (bPyCl), [EMIM]BF <sub>4</sub> , [BMIM][N(CN) <sub>2</sub> ], [BMIM][H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ], [BMIM] <sub>2</sub> [SO <sub>4</sub> ], [HOOCH <sub>2</sub> MIM]Cl, [BMIM][HSO <sub>4</sub> ], [(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> N][Cl], [BMIM]BF <sub>4</sub> .	Micro-ondas.	Razão sólido/líquido, 1:30; LI [BMIM][Br] 2,5 mol L <sup>-1</sup> (com HCl 0,8 mol L <sup>-1</sup> ) (aquoso); tempo, 10 min; temperatura, 70 °C.	Miricetina e quercetina
Du, Xiao and Li, (2007).	Rizoma (Rhizma Polygoni Cuspidati) de Polygonum Cuspidatum	[BMIM][Cl], [BMIM][Br] e [BMIM]BF <sub>4</sub> .	Micro-ondas.	Razão sólido/líquido 1:20; LI [BMIM][Br] 2,5 mol L <sup>-1</sup> (aquoso); tempo, 10 min; potência do micro-ondas, 1000 W; temperatura, 60 °C.	<i>Trans</i> -resveratrol.

Referência	Amostra	LIs testados	Método de extração	Condições de extração	Compostos bioativos extraídos
Lou et al. (2012).	Folhas de bardana ( <i>Arctium lappa</i> L.).	[C <sub>4</sub> MIM][Cl], [C <sub>4</sub> MIM][Br], [C <sub>2</sub> MIM][Br], [C <sub>6</sub> MIM][Br], [C <sub>8</sub> MIM][Br], [C <sub>4</sub> MIM][BF <sub>4</sub> ], [C <sub>4</sub> MIM][H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ].	e Ultrassom e micro-ondas.	Razão sólido/líquido 1:20; LI [C <sub>4</sub> MIM][Br] 1,5 mol L <sup>-1</sup> (aquoso); potência do US, 50 W; potência do micro-ondas, 400 W; tempo, 30 s; temperatura não disponível.	Ácido cafeico, quercetina e ácido clorogênico.
Ma et al. (2010).	Folhas de lótus ( <i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.).	[C <sub>4</sub> MIM][Cl], [C <sub>4</sub> MIM][Br], [C <sub>2</sub> MIM][Br], [C <sub>6</sub> MIM][BF <sub>4</sub> ], [C <sub>4</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ], [C <sub>6</sub> MIM][Br], [C <sub>8</sub> MIM][Br].	e Micro-ondas.	Razão sólido/líquido, 1:30; LI [C <sub>6</sub> MIM][Br] 1 mol L <sup>-1</sup> (aquoso); potência do micro-ondas, 280 W; tempo 2 min; temperatura não disponível.	Alcaloides (N-nornuciferina, O-nornuciferina e nornuciferina).
Cao et al. (2009).	Pimenta branca ( <i>Piper nigrum</i> L.).	[C <sub>4</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ], [C <sub>4</sub> MIM][H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ], [C <sub>4</sub> SO <sub>3</sub> MIM][Br], [C <sub>6</sub> MIM][BF <sub>4</sub> ], [C <sub>4</sub> MIM][Br], [C <sub>4</sub> MIM][BF <sub>4</sub> ].	e Ultrassom.	Razão sólido/líquido 1:15; LI [C <sub>4</sub> MIM][BF <sub>4</sub> ] 2 mol L <sup>-1</sup> (aquoso); potência do US, 500 W; tempo 30 min; temperatura não disponível.	Piperina.
Martins and De Rosso, (2016).	Tomate.	[BMIM][Cl], [BMIM][PF <sub>6</sub> ].	e Ultrassom.	5 g de amostra; LI [BMIM][Cl] 1:1 com etanol; tempo, 5 min; temperatura, 0 °C.	Licopeno.
Murador et al. (2019).	Casca de laranja.	[BMIM][Cl], [BMIM][PF <sub>6</sub> ], [BMIM][BF <sub>4</sub> ], [BMIM][Cl].	e Ultrassom.	Razão sólido/líquido 1:3; LI [BMIM][Cl] 1:2 com etanol; potência e frequência do US, 200 W/20 kHz; time 5 min; ciclos de extração, 6; extração em banho de gelo.	Carotenoides.
Mesquita et al. (2019).	Fruta ( <i>Bactris gasipaes</i> ).	[C <sub>4</sub> MIM][BF <sub>4</sub> ], [C <sub>6</sub> MIM][Cl], [C <sub>4</sub> MIM][Cl], [C <sub>4</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ].	e Ultrassom.	Razão sólido/líquido 1:1; LI [C <sub>4</sub> MIM][BF <sub>4</sub> ] 1:1 com etanol; tempo 12 min; ciclos de extração 4; potência do US e temperatura não disponíveis.	Carotenoides.

Referência	Amostra	LIs testados	Método de extração	Condições de extração	Compostos bioativos extraídos
Kou et al. (2018).	Gengibre.	[C <sub>4</sub> MIM][Cl], [C <sub>4</sub> MIM][Br], [C <sub>4</sub> MIM][BF <sub>4</sub> ], [C <sub>4</sub> MIM][HSO <sub>4</sub> ], [C <sub>2</sub> MIM][BF <sub>4</sub> ], [C <sub>3</sub> MIM][BF <sub>4</sub> ] [C <sub>5</sub> MIM][BF <sub>4</sub> ].	Ultrassom.     e	Razão sólido/líquido, 1:20; LI [C <sub>4</sub> MIM][BF <sub>4</sub> ] 1,5 mol L <sup>-1</sup> (aquoso); potência do US, 200 W; tempo de extração, 10 min; temperatura, 25 °C.	Gingeróis (6-gingerol, 8-gingerol e 10-gingerol) e polissacarídeos bioativos.

A Figura 10 apresenta os principais LIs usados nas condições otimizadas dos trabalhos mencionados na Tabela 4 para a extração de diferentes compostos bioativos. Os principais LIs utilizados nos trabalhos foram compostos pelos ânions Br, BF<sub>4</sub> e Cl e os principais cátions apresentaram comprimentos das cadeias alquilas entre C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub> e C<sub>12</sub>. Além disso, as concentrações de LIs variaram de soluções aquosas entre 0,2 a 2,5 mol L<sup>-1</sup>, sendo que apenas dois trabalhos utilizaram o LI associado ao etanol como cossolvente para preparar a solução de extração.

Figura 10 - Principais LIs utilizados para a extração de compostos bioativos reportados na Tabela 4. [C<sub>6</sub>MIM][Br] (A); [BMIM][Br] ou [C<sub>4</sub>MIM][Br] (B); [BMIM][BF<sub>4</sub>] ou [C<sub>4</sub>MIM][BF<sub>4</sub>] (C); [BMIM][Cl] (D); [C<sub>12</sub>MIM][Br] (E).



Fonte: autor

Nos artigos discutidos na Tabela 4, foi possível observar as variações dos ânions utilizados nos LIs. Os ânions hidrofóbicos podem produzir LIs miscíveis em água e aumentar a interação na solução de extração. Nesse sentido, a alteração de ânions em um LI promove alterações essenciais nas propriedades de um LI. Por outro lado, alguns trabalhos, como Kou *et al.*, (2018), Lou *et al.*, (2012) e Ma *et al.*, (2011) apresentados na Tabela 4 estudam a variação no comprimento da cadeia alquílica de um LI como demonstrado na Figura 10, sendo responsável pelas propriedades de viscosidade da substância. A variação da fração catiônica também pode influenciar a hidrofobicidade ou a capacidade de um LI em fazer ligações de hidrogênio. Em

resumo, LI com cadeias alquílicas mais longas tendem a formar agregados que bloqueiam o acesso de solutos ao anel imidazólico (BARRULAS; PAIVA; CORVO, 2019; HUDDLESTON *et al.*, 2001).

De acordo com a Tabela 4, a maioria dos trabalhos têm usado métodos de extração assistidos por ultrassom ou por micro-ondas para recuperar compostos bioativos. A faixa de temperatura utilizada nos trabalhos varia de 0 °C (para extração de licopeno) a 70 °C (para a extração de miricetina e quercetina). Alguns autores não mencionaram a temperatura utilizada em seus procedimentos, porém, o controle deste parâmetro de alguma maneira é fundamental para evitar a degradação dos compostos termolábeis, sendo altamente recomendável seu ajuste e controle.

É possível observar que atualmente, o uso de líquidos iônicos na extração de compostos bioativos tem sido um tema que vem crescendo nos últimos anos, sendo aplicado em várias matrizes com o objetivo de ser utilizado como solvente alternativo para contribuir em processos inovadores, além de diminuir o tempo de reação de vários métodos tradicionais, com consequente redução de energia, água, combustível e emissão de carbono (BENVENUTTI; ZIELINSKI; FERREIRA, 2019; CHOI; VERPOORTE, 2019; KOU *et al.*, 2018; MURADOR *et al.*, 2019).

Dessa maneira, o uso de LI como solvente extrator de compostos bioativos, em especial os compostos fenólicos, frente aos tradicionais VOS foi investigado.

## **5 MATERIAL E MÉTODOS – ETAPAS 2, 3 e 4**

### **5.1 PROSPECÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA – ETAPA 2**

Uma prospecção científica e tecnológica foi realizada de modo a conhecer a atual situação do uso dos LIs em processos de extração.

Para a prospecção científica, as buscas dos artigos científicos foram realizadas nas bases de dados *Science Direct*, *Scopus*, *SciELO* e Periódicos Capes, compreendendo o período entre 2000 e 2018, utilizando os seguintes descritores: “*ionic liquid\**” e “*ionic liquid\* AND extraction*” (bases internacionais) e “líquidos iônicos” e “líquidos iônicos AND extração” (bases nacionais).

As buscas foram realizadas em modo avançado, e os resultados refinados para a área de Ciência de Alimentos, e quando disponível, filtros (*Agricultural and Biological Sciences* para o *Science Direct* e Ciências Exatas e da Terra para o portal SciELO) foram aplicados para

melhor visualização do número de trabalhos publicados com a temática. No website *Scopus* os gráficos foram gerados no diretamente no site.

A prospecção tecnológica nas bases de patentes do INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial - nacional) e ESPACENET (*European Patent Office* - internacional) foi realizada utilizando os mesmos descritores, entretanto, foram utilizadas associações com os códigos da Classificação Internacional de Patentes (IPC, do inglês) conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 - Códigos IPC utilizados na busca de patentes

<b>Código</b>	<b>B</b>	<b>01</b>	<b>D</b>	<b>11</b>	<b>02</b>
Descrição	Operações de processamento; transporte	Processos ou aparelhos físicos ou químicos em geral	Separação	Extração com solventes	De sólidos
<b>Código</b>	<b>B</b>	<b>01</b>	<b>D</b>	<b>11</b>	<b>04</b>
Descrição	Operações de processamento; transporte	Processos ou aparelhos físicos ou químicos em geral	Separação	Extração com solventes	De soluções líquidas
<b>Código</b>	<b>B</b>	<b>01</b>	<b>J</b>	<b>8</b>	<b>00</b>
Descrição	Operações de processamento; transporte	Processos ou aparelhos físicos ou químicos em geral	Processos químicos ou físicos, p. Ex. Catálise ou química coloidal; aparelhos pertinentes aos mesmos	Processos químicos ou físicos em geral, realizados na presença de fluidos e partículas sólidas; aparelhos para esses processos	

As informações obtidas foram organizadas em gráficos (software Microsoft Excel®) para melhor visualização e interpretação de dados. O software CSVed foi utilizado para a extração dos dados das bases de patentes.

## 5.2 EXPERIMENTOS LABORATORIAIS

### 5.2.1 Etapa 3

#### 5.2.1.1 Amostras

Amostras de goiabas vermelhas (*Psidium guajava* L.) maduras e frescas foram adquiridas em mercado local da cidade de Florianópolis, SC, Brasil (27°35'48" sul, 48°32'57" oeste), em março de 2019. Ressalta-se que como se trata de um produto vegetal e natural, variações em sua composição química provenientes de fatores edafoclimáticos (clima, relevo, litologia, temperatura, umidade do ar, radiação, tipo de solo, vento, composição atmosférica e precipitação pluvial) podem ocorrer. Todas as frutas foram lavadas com água potável e higienizadas por 15 min. com solução de hipoclorito de sódio (100 mg L<sup>-1</sup>, seguido de 5 mg L<sup>-1</sup>) e, em seguida foram armazenadas em refrigeração até o momento do processamento. As frutas foram levadas a uma despulpadeira industrial (BRAMEITAR Campinas, Brasil) e o resíduo obtido, composto por sementes, casca e sobras de polpa, foi coletado separadamente da polpa, representando cerca de 36% do peso total. O resíduo da goiaba foi seco em estufa (Tecnal, TE 394/2, Piracicaba, Brasil) a 55 °C por 10 h (LIMA *et al.*, 2019), triturado em moinho de martelo (Tecnal, TE 090, Piracicaba, Brasil) e em moinho analítico (IKA A11 basic São Paulo, Brazil) e posteriormente transferidos para uma peneira de 60 Tyler mesh para padronização do tamanho de partícula. A amostra em pó do resíduo de goiaba foi embalada a vácuo em sacos grau alimentício e mantidas a -24 °C até análise posterior.

#### 5.2.1.2 Síntese do líquido iônico [BMIM][Cl]

A síntese do LI [BMIM][Cl] foi realizada partir dos reagentes 1 Metilimidazólio (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>) e 1 Clorobutano (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>Cl) (Sigma Aldrich, St Louis, MO) através de uma reação de alquilação (FANG *et al.*, 2007).

A escolha do LI [BMIM][Cl] foi baseada em seu potencial de recuperar compostos bioativos (MARTINS e ROSSO, 2014), devido principalmente à sua capacidade de dissolver grandes porções de celulose (NEMESTÓTHY *et al.*, 2017) liberando os compostos de interesse para a solução extratora, e também pelo fato de este é um dos LIs mais utilizados como solvente (BERTHOD; RUIZ-ÁNGEL; CARDA-BROCH, 2017; HUDDLESTON *et al.*, 1998; VENTURA *et al.*, 2017).

Em um balão de fundo redondo o [BMIM][Cl] foi sintetizado a partir da mistura em concentrações de 0,5 mol L<sup>-1</sup> de 1 Metilimidazólio (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>) e 1 Clorobutano (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>Cl). Os reagentes foram submetidos à agitação e refluxo por 72 h em temperatura de 80 °C, até a formação de um líquido amarelo viscoso, que em seguida, foi seco em evaporador rotativo sob vácuo a 100 °C, e então cristalizado a -40 °C. Para reduzir o consumo de VOS, não foram

realizados procedimentos adicionais de purificação (CARDA–BROCH; BERTHOD; ARMSTRONG, 2003; FANG *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2016).

A remoção do LI [BMIM][Cl] dos extratos não foi avaliada, pois os extratos não foram utilizados para aplicação tecnológica em produtos alimentícios.

#### 5.2.1.2.1 Caracterização química do líquido iônico sintetizado

O LI gerado a partir da síntese foi caracterizado quanto ao seu rendimento, ponto de fusão e ao seu padrão de fragmentação por espectrometria de massas (MS).

O rendimento foi calculado com base na molaridade do LI resultante ( $C_8H_{15}ClN_2 = 174,6705$  g/mol), para tanto, antes de cada síntese, a massa do recipiente livre de impurezas e seco previamente em estufa a 105 °C utilizado para o experimento foi anotada. Logo após de cada síntese, foi tomada a massa total juntamente com o LI sintetizado, e então comparado com o valor teórico calculado a partir da diferença de massa entre o valor teórico e o obtido (Equação 1).

$$\text{Rendimento do LI [BMIM][Cl]} = \frac{(\text{massa final} \times 100)}{\text{massa inicial (teórica)}} \quad (\text{Eq 1})$$

A temperatura de fusão (Microquímica Equipamentos, MQAPF-302, São Paulo, Brasil) foi determinada utilizando uma pequena alíquota do [BMIM][Cl], que foi aquecida gradativamente a partir de 25 °C até 70 °C até que fosse observada a completa fusão do LI.

Para avaliação do padrão de fragmentação em espectrômetro de massas (MS/MS) (micrOTOF-Q II Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), a amostra de LI foi dissolvida em metanol e diretamente injetada, seguindo as condições: fonte de ionização por “electrospray” (ESI) em modo positivo, voltagem do capilar de 4500 V, fluxo do gás de 4.0 L/min, pressão do nebulizador a 0,4 bar, em temperatura de 200 °C., com base na técnica descrita por Martins e De Rosso (2016). O software mMass – *Open-Source Mass Spectrometry Tool* foi utilizado para o tratamento de dados.

#### 5.2.1.3 Extração de compostos fenólicos do resíduo do processamento da goiaba usando LI [BMIM][Cl] assistido por ultrassom

##### 5.2.1.3.1 Delineamento experimental

Foi utilizado um planejamento experimental fatorial completo  $2^3$  com pontos centrais para identificar os parâmetros significativos ( $p < 0,05$ ) nas respostas de composição fenólica total (método de *Prussian Blue*) e potencial antioxidante (método DPPH) do resíduo do processamento da goiaba. Os parâmetros: concentração do LI [BMIM][Cl] (soluções aquosas a 0,4; 1,45 e 2,5 mol L<sup>-1</sup>), tempo de extração (10, 25 e 40 min) e temperatura de extração (35, 45 e 55 °C) foram avaliados levando em consideração os trabalhos em literatura avaliando concentrações dos LIs e os parâmetros possíveis de serem ajustados no equipamento de ultrassom, respectivamente. Além disso, uma extração com metanol 100% (CH<sub>3</sub>OH) (25 min, a 45 °C – condição de ponto central do planejamento  $2^3$ ) foi realizada para comparação com os resultados obtidos para o LI [BMIM][Cl]. A extração com metanol para fins comparação na etapa de triagem foi realizada exclusivamente na etapa 3 do trabalho.

#### 5.2.1.3.2 *Extração dos compostos fenólicos do resíduo da goiaba com ELIAU e VOS*

As extrações dos compostos fenólicos foram realizadas em triplicata em banho ultrassônico (165 W, 37 kHz) (Eco-Sonics, Ultronique, Q5.937A, Indaiatuba, Brasil), sendo que 1 mL das soluções do LI [BMIM][Cl] foram adicionadas em 0,06 g de amostra (testado em experimentos prévios) e submetidos a extração em banho de ultrassom. Os extratos foram centrifugados em 8400 g por 10 min (Novatécnica, NT800) para a separação da fase sólida, e o sobrenadante coletado e armazenado a -18 °C até o momento das análises.

#### 5.2.1.4 *Análises fitoquímicas in vitro*

##### 5.2.1.4.1 *Fenólicos totais*

O teor de fenólicos das amostras foi avaliado utilizando o método de *Prussian Blue* (PRICE; BUTLER, 1977). A metodologia foi adaptada para realização em microplacas (MARGRAF et al., 2015). Primeiramente, uma alíquota de 100 µL dos extratos do resíduo da goiaba foi colocada em microplacas de 96 poços, depois 100 µL de uma solução de cloreto férrico hexahidratado FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,5 mmol L<sup>-1</sup>) foram adicionados deixando-se reagir por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 µL de ferrocianeto de potássio 0,5 mmol L<sup>-1</sup>, e após 15 min no escuro, a absorbância foi registrada em 725 nm usando um leitor de microplacas (SpectraMax®, Paradigm®, Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Os resultados foram calculados de acordo com uma curva analítica equivalente a um composto fenólico reconhecido entre as matrizes vegetais, como o ácido gálico (com faixa linear entre 0 e 15 mg L<sup>-1</sup>) (Sigma-

Aldrich, China), expressa em  $\text{mg g}^{-1}$ , e dois brancos (um de análise e outro só com o LI) realizados paralelamente.

#### 5.2.1.5 Avaliação do potencial antioxidante *in vitro*

##### 5.2.1.5.1 Potencial antioxidante baseado na captura do radical DPPH

O potencial antioxidante avaliado pela captura do radical DPPH (Sigma-Aldrich, Alemanha) foi realizado com base na metodologia de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) adaptada para microplacas de 96 poços. Uma alíquota de 40  $\mu\text{L}$  de extrato inicial do resíduo de goiaba foi colocada em uma microplaca, depois foram adicionados 260  $\mu\text{L}$  de uma solução metanólica de DPPH (0,1  $\text{mmol L}^{-1}$ ). Após 30 minutos em ambiente escuro, a absorbância foi registrada em 517 nm em um leitor de microplacas. Os resultados foram calculados de acordo com uma curva analítica equivalente a um antioxidante natural reconhecido, o ácido ascórbico (com faixa linear entre 2 e 30  $\text{mg L}^{-1}$ ), expressa em  $\text{mg g}^{-1}$ , e dois brancos (um de análise e outro só com o LI) realizados paralelamente.

##### 5.2.1.6 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Os testes de ANOVA seguidos pelo teste de Tukey (5% de significância) foram calculados através do software SASM-Agri para verificar diferenças estatísticas entre os tratamentos. As normalidades dos resíduos foram analisadas visualmente e através do teste de Ryan Joiner para avaliar se os modelos ajustados são confiáveis.

Para a modelagem matemática e computacional, o software *Statistica* 13.5 (fornecido pela UFSC) foi utilizado. Os ajustes do modelo (*lack of fit*) e os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e determinação ajustado ( $R^2_{\text{adj}}$ ) foram avaliados.

## 5.2.2 Etapa 4

### 5.2.2.1 Amostras

Amostras de goiabas vermelhas (*Psidium guajava* L.) orgânicas, maduras e frescas foram adquiridas em mercado local da cidade de Florianópolis, SC, Brasil (27°35'48" sul, 48°32'57" oeste), em março de 2019. Todos os processos posteriores de preparo de amostra seguiram conforme item 5.2.1.1.

### 5.2.2.2 Síntese do líquido iônico [BMIM][Cl]

A síntese do LI [BMIM][Cl] foi realizada conforme item 5.2.1.2.

#### 5.2.2.2.1 Caracterização química do líquido iônico sintetizado

O LI gerado a partir da síntese foi caracterizado conforme item 5.2.1.2.1.

### 5.2.2.3 Extração com LI assistida por ultrassom (ELIAU) para obtenção do extrato bioativo otimizado do resíduo do processamento da goiaba

#### 5.2.2.3.1 Delineamento experimental

Foi realizado um planejamento fatorial completo  $2^4$  com pontos centrais de triagem para avaliar a influência dos parâmetros relação amostra/solvente (30, 65 e 100 g L<sup>-1</sup>), tempo de ultrassom (10, 25 e 40 min), temperatura (35,45 e 55 °C) e tipo de LI ([BMIM][Cl], [BMIM][BF<sub>4</sub>], ou a mistura 1:1 desses LIs) na extração assistida por ultrassom (ELIAU) de compostos fenólicos do resíduo do processamento da goiaba (Tabela 10). Os LIs utilizados foram soluções aquosas de 2,5 mol L<sup>-1</sup> de [BMIM][Cl] sintetizado e 2,5 mol L<sup>-1</sup> de [BMIM][BF<sub>4</sub>] (Sigma-Aldrich, Co, St louis, USA), conforme estudada a efetividade dessa concentração na etapa 3 do trabalho. As concentrações utilizadas também foram previamente estudadas (DU *et al.*, 2009; DU; XIAO; LI, 2007; FAN *et al.*, 2012; MA, C. *et al.*, 2011).

Após determinados os parâmetros significativos na extração dos compostos fenólicos utilizando ELIAU, foi utilizado um delineamento composto central rotacional (DCCR)  $2^2$  para avaliar o melhor LI entre [BMIM][Cl] e [BMIM][BF<sub>4</sub>] (0, 14, 50, 85 e 100%) e a razão amostra-solvente (5, 20, 55, 90 e 104 g L<sup>-1</sup>) avaliado por superfície de resposta e função desejabilidade (ajustado para 100 iterações) para otimizar a extração dos compostos fenólicos com ação antioxidante do resíduo do processamento da goiaba.

Ambos os planejamentos foram avaliados em função das respostas de compostos fenólicos totais (método de *Prussian Blue*) e atividade antioxidante (métodos DPPH e FRAP).

#### 5.2.2.3.2 Extração dos compostos fenólicos do resíduo da goiaba com ELIAU e VOS

A massa das amostras de resíduo de goiaba foi mensurada em balança analítica (BEL – Mark M214AMonza, Itália) em micro tubos de centrifugação, após foi adicionado o LI extrator e rapidamente misturados em vortex. Em seguida, as amostras foram levadas a extração em banho de ultrassom operando com potência total (165 W) a uma frequência de 37 kHz, e após centrifugadas em 8400 g por 10 min (Novatécnica, NT800, Piracicaba, Brasil) para a separação da fase sólida, e o sobrenadante coletado e armazenado a -18 °C até o momento das análises.

Adotada a condição otimizada, esta foi avaliada em comparação com uma série de solventes orgânicos (etanol 100%, etanol 80 %, etanol 50 %, metanol 100%, metanol 80 % e metanol 50 %), água e água acidificada (1% ácido acético), solventes tradicionalmente utilizados para a extração de compostos fenólicos de matrizes vegetais.

#### 5.2.2.4 Análises fitoquímicas *in vitro*

##### 5.2.2.4.1 Fenólicos totais

O teor de fenólicos das amostras foi avaliado conforme item 5.2.1.4.1.

##### 5.2.2.4.2 Flavonóis totais

O conteúdo de flavonóis totais das amostras foram avaliados (YERMAKOV; ARASIMOV; YAROSH, 1987). Uma alíquota de 80 µL da amostra foi adicionada em uma placa de 96 poços, depois 80 µL de solução etanólica a 2 % (m/v) de cloreto de alumínio hexahidratado foram misturados e deixados entre 3 a 4 min para reagir. Subsequentemente, 120 µL de acetato de sódio (50 g L<sup>-1</sup>) foram adicionados, e após 2,5 horas a absorbância foi registrada em 440 nm usando um leitor de microplacas. Os resultados foram calculados de acordo com uma curva analítica equivalente a um flavonol conhecido, a quercetina (com faixa linear entre 0 a 55 mg L<sup>-1</sup>) (adquiridos da Sigma-Aldrich), expressa em mg g<sup>-1</sup>, e dois brancos (um de análise e outro só com o LI) realizados paralelamente (GRANATO; NUNES, 2016).

##### 5.2.2.4.3 Taninos condensados

Os taninos condensados foram avaliados pelo método vanilina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (HAGERMAN, 2002). Para a análise utilizando microplaca de 96 poços misturou-se uma alíquota de 25 µL de extrato do resíduo de goiaba com 150 µL de solução metanólica de vanilina a 4% (m/v) e 75

$\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 32% (v/v), depois de 15 min a absorbância foi registrada em 500 nm usando um leitor de microplacas (HORSZWALD; ANDLAUER, 2011). Os resultados foram calculados de acordo com uma curva analítica equivalente a um composto reconhecido pertencente ao grupo, como a catequina (com faixa linear entre 60 a 300  $\text{mg L}^{-1}$ ) (Sigma-Aldrich, St.Louis, EUA), dada em  $\text{mg g}^{-1}$ , e dois brancos (um de análise e outro só com o LI) realizados paralelamente.

#### 5.2.2.4.4 *Orto-difenóis*

Para determinação dos compostos fenólicos de baixo peso molecular da classe dos *orto*-difenóis, 50  $\mu\text{L}$  da amostra foram distribuídos em placas de microanálise de 96 poços, em seguida foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de solução de molibdato de sódio dihidratado a 5% (m/v). Depois de 25 min em repouso foi realizada o registro da absorbância em 370 nm em leitor de microplacas (MAESTRO DURÁN *et al.*, 1991). Os resultados foram calculados de acordo com uma curva analítica equivalente a um composto *orto*-difenol conhecido, o ácido cafeico (com faixa linear entre 0 a 80  $\text{mg L}^{-1}$ ) (Sigma-Aldrich, Suíça), expressa em  $\text{mg g}^{-1}$ , e dois brancos (um de análise e outro só com o LI) realizados paralelamente.

#### 5.2.2.5 *Avaliação do potencial antioxidante in vitro*

##### 5.2.2.5.1 *Potencial antioxidante baseado na captura do radical DPPH*

O potencial antioxidante foi avaliado conforme item 5.2.1.5.1. Entretanto para o planejamento fatorial completo  $2^4$  da etapa 4, foi considerada a inibição normalizada (IN) com a massa da amostra, por conta do parâmetro razão amostra/solvente, conforme a equação 2:

$$\text{inibição normalizada} = \frac{[1 - (\frac{A_{517\text{amostra}}}{A_{517\text{branco}}})] \times 100}{g \text{ amostra}} \quad (\text{Eq 2})$$

##### 5.2.2.5.2 *Atividade antioxidante baseada na redução do ferro (Ferric-reducing antioxidant power - FRAP)*

O ensaio de FRAP também foi utilizado para determinar o potencial antioxidante das amostras do resíduo do processamento da goiaba (BENZIE; STRAIN, 1996). A metodologia foi adaptada para análise de microplacas, de modo que 20  $\mu\text{L}$  de amostra do resíduo de goiaba foram adicionados em microplaca, depois 280  $\mu\text{L}$  de solução FRAP (1:1:10 de 2,4,6-tris

(2piridil)-s-trizina (Sigma-Aldrich, Suíça); 20 mmol L<sup>-1</sup> de cloreto férrico hexahidratado; 300 mmol L<sup>-1</sup> de tampão de acetato de sódio pH 3,6) foram misturados. Após 30 min de incubação a 37 °C, a absorbância foi registrada em 593 nm. Os resultados foram calculados de acordo com uma curva analítica equivalente a um antioxidante natural reconhecido, o ácido ascórbico (com faixa linear entre 0 a 50 mg L<sup>-1</sup>), expressa em mg g<sup>-1</sup>, e dois brancos (um de análise e outro só com o LI) realizados paralelamente.

#### 5.2.2.5.3 Potencial antioxidante baseada no sequestro do radical ABTS

O sequestro do radical ABTS (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi avaliado (RUFINO *et al.*, 2007) utilizando uma solução estoque de 7 mmol L<sup>-1</sup> de ABTS misturada 16 horas antes da análise com 140 mmol L<sup>-1</sup> de persulfato de potássio na proporção de 5:0,08 mL, respectivamente. Logo antes da análise, a solução de trabalho do ABTS foi ajustada com etanol até atingir a absorbância próxima de 0,700 em 734 nm. Posteriormente, 10 µL do extrato inicial das amostras foram colocados em microplacas de 96 poços e adicionados de 290 µL da solução de trabalho de ABTS. Após 6 minutos no escuro, a absorbância foi registrada e os resultados foram calculados de acordo com uma curva analítica equivalente a um antioxidante sintético, Trolox (*6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid*) (com faixa linear entre 5 e 150 mg L<sup>-1</sup>) (Acros Organics, Nova Jersey, EUA), em mg g<sup>-1</sup>, e dois brancos (um de análise e outro só com o LI) realizados paralelamente.

#### 5.2.2.5.4 Poder quelante frente aos íons Fe<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup>

O poder quelante frente ao íon ferroso foi avaliado por método descrito por Carter (1971), com modificações, em que 50 µL de amostra diluída foi colocada em microplaca de 96 poços, em seguida, foram adicionados 160 µL de água ultrapura e 15 µL de sulfato de cloreto de ferro (II) tetrahidratado (0,30 mmol L<sup>-1</sup>). Após 5 min, 30 µL de ferrozina (0,80 mmol L<sup>-1</sup>) foram adicionados na microplaca com as amostras, mantendo-se em repouso por 15 minutos. A absorbância foi registrada em 562 nm em leitor de microplacas. Como controle negativo, a solução de ferrozina foi substituída por água ultrapura. A resposta foi calculada em termos de inibição da formação do complexo Fe<sup>2+</sup>-ferrozina (%) de acordo com a equação 3 (SANTOS, *et al.*, 2017).

$$\text{inibição do complexo Fe - ferrozina (\%)} = 1 - \frac{[\text{Abs amostra} - \text{Abs solução sem ferrozina}]}{\text{Abs controle}} \times 100 \quad (\text{Eq 3})$$

O poder quelante frente ao íon cúprico foi avaliado de acordo com o método descrito por Saiga, Tanabe e Nishimura (2003) com modificações, sendo que 30 µL de amostra diluída em 200 µL de uma solução de acetato de sódio (50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 6) foi adicionada em microplaca, seguida da adição de 30 µL de uma solução de sulfato de cobre pentahidratado (0,1 mg mL<sup>-1</sup>). Após 2 min, uma solução de violeta de pirocatecol (2 mmol L<sup>-1</sup>) foi adicionada a placa, agitando-se e após 20 min a absorbância foi registrada em 632 nm em leitor de microplacas. A resposta foi calculada em termos de inibição da formação do complexo Cu<sup>2+</sup>-pirocatecol (%) de acordo com a equação 4 (SANTOS *et al.*, 2017).

$$\text{inibição do complexo Cu - pirocatecol \%} = 1 - \left( \frac{\text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq 4})$$

#### 5.2.2.6 Inibição biológica *in vitro* da peroxidação lipídica em gema de ovo

Para avaliar o potencial antioxidante com base na inibição da peroxidação lipídica em gema de ovo foi utilizado o método de Margraf *et al.* (2016). Primeiramente 500 µL de homogenato de gema (25 g L<sup>-1</sup> de gema de ovo + 0,1 mol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato de sódio pH 7,4) e 50 µL de uma solução de sulfato ferroso (4 mmol L<sup>-1</sup>) foram adicionados em 50 µL de amostra. A solução resultante foi mantida em banho-maria (37 °C) por 45 minutos. Em seguida, foram adicionados 500 µL de ácido acético a 20 % (v/v) (pH 3,5) e 1 mL de solução de ácido tiobarbitúrico a 0,67 %. A solução foi mantida novamente em banho-maria (95 °C) por 30 min, depois centrifugada (8400 g/10 min), e finalmente o sobrenadante plaqueado e a absorbância registrada em 532 nm, e dois brancos (um de análise e outro só com o LI) realizados paralelamente. Os resultados foram calculados de acordo com a equação 5.

$$\text{Inibição \%} = \frac{([\text{Abs branco} - \text{Abs amostra}])}{\text{Abs branco}} \times 100 \quad (\text{Eq 5})$$

#### 5.2.2.7 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas conforme item 5.2.1.6. Além disso, os efeitos dos parâmetros avaliados na otimização foram modelados, também como, as superfícies de respostas foram apresentadas para ilustrar os dados obtidos.

Para a etapa 4, a desejabilidade as variáveis tipo de LI e razão amostra/solvente foram avaliadas através das respostas de compostos fenólicos totais e potencial antioxidante por dois métodos, além disso foram utilizadas 100 iterações para obter a resposta máxima para as 3 respostas dentro dos níveis estudados. Os parâmetros otimizados foram realizados e comparados com os valores preditos (intervalo de confiança de 95%), também, o índice D foi usado para avaliar os valores otimizados (MACIEL; TEIXEIRA; BLOCK, 2020).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 ETAPA 2

#### 6.1.1 Prospecção Científica

As buscas nas bases de literatura científica revelaram muitos trabalhos nos últimos anos e muitas aplicações dos LIs. Os resultados encontrados podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 - Número de trabalhos recuperados nas bases de dados científicas contendo os descritores utilizados.

Bases de Pesquisa	Filtro Aplicado (Ciência de Alimentos)	Descritores	Resultados
Science Direct	Agricultural and Biological Sciences	<i>ionic liquid*</i>	8001
	Agricultural and Biological Sciences	<i>ionic liquid* AND extraction</i>	3159
Scielo	Ciências Exatas e da Terra e Engenharias	<i>ionic liquid*</i>	110
	Ciências Exatas e da Terra e Engenharias	<i>ionic liquid* AND extraction</i>	5
	Ciências Exatas e da Terra e Engenharias	líquidos iônicos	45
	Ciências Exatas e da Terra e Engenharias	líquidos iônicos AND extração	2
Periódicos CAPES	Nd	<i>ionic liquid*</i>	61782
	Nd	<i>ionic liquid* AND extraction</i>	2866
	Nd	líquidos iônicos	44
	Nd	líquidos iônicos AND extração	0

nd: não disponível.

No portal *Science Direct*, com os termos e filtros aplicados, foi verificado um total de 8001 trabalhos contendo o termo “*ionic liquid\**” no título dos estudos. Com a agregação do termo “*extraction*” a busca retornou 3159 trabalhos, demonstrando que há um número expressivo de artigos científicos utilizando líquidos iônicos para a extração de diferentes compostos.

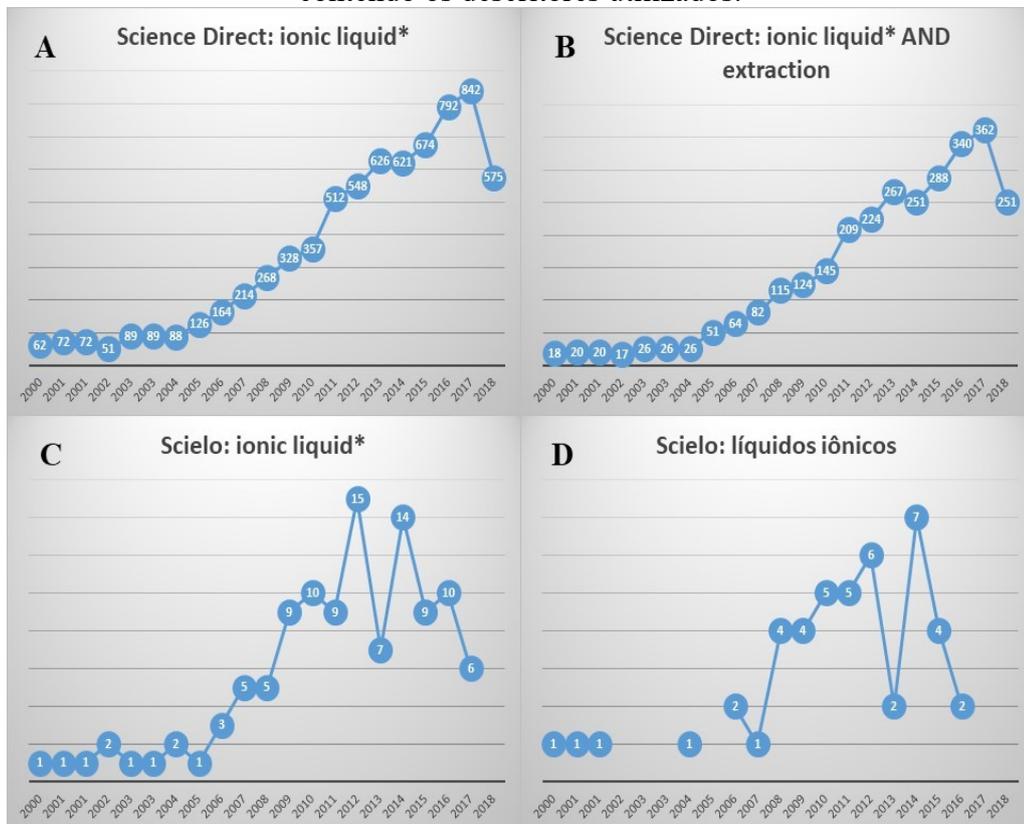
A busca de trabalhos científicos no portal *Scielo* utilizando o filtro de pesquisa das áreas de Ciências Exatas e da Terra e Engenharias, revelou menos trabalhos, sendo 5 e 2 trabalhos com os termos “*ionic liquid\* AND extraction*” e “líquidos iônicos AND extração”, respectivamente. O menor número de trabalhos nessa base de dados em relação à *Science Direct* sobre os “líquidos iônicos”, provavelmente é devido ao fato de que ela abriga revistas científicas de apenas 14 países.

A busca na base Periódicos Capes retornou inicialmente o maior número de trabalhos sobre o tema, em função da limitação do portal em adicionar filtros de pesquisa por área de trabalho. Porém, nenhum trabalho foi encontrado relacionado o termo “líquidos iônicos AND extração” o que indica a lacuna nas pesquisas dessa área até a data desta pesquisa e o potencial futuro no estudo dos LIs para extração de compostos de interesse.

A Figura 11 mostra a evolução no número de trabalhos relacionando os descritores pesquisados. No portal *Science Direct* relacionando os termos “*ionic liquid\**” (Figura 11 A) e “*ionic liquid\* AND extraction*” (Figura 11 B) o ano de 2017 concentrou maior número de publicações, totalizando 1204 trabalhos sobre ambos os temas, o crescimento continua constante quando observado que no primeiro semestre de 2018 foram publicados aproximadamente 68 % do número total de trabalhos em relação ao ano anterior. No portal *Scielo* utilizando o descritor “*ionic liquid\**” (Figura 11 C) observou-se que em 2012 foi relacionado o maior número de trabalhos publicados, e ao relacionar o termo “líquidos iônicos” foi possível observar a concentração em particular de trabalhos sobre o tema no ano de 2015 (Figura 11 D).

O elevado número de trabalhos relacionados com o tema, principalmente em portais de pesquisa internacionais está relacionado com a expansão e a vasta aplicação dos líquidos iônicos para diversas finalidades na ciência de alimentos, assim como procedimentos de extração de metais, na extração de compostos aromáticos, extração de compostos fenólicos (*trans-resveratrol*, por exemplo), extração de aminoácidos, entre outros (MARTINS, P. L. G.; BRAGA; DE ROSSO, 2017).

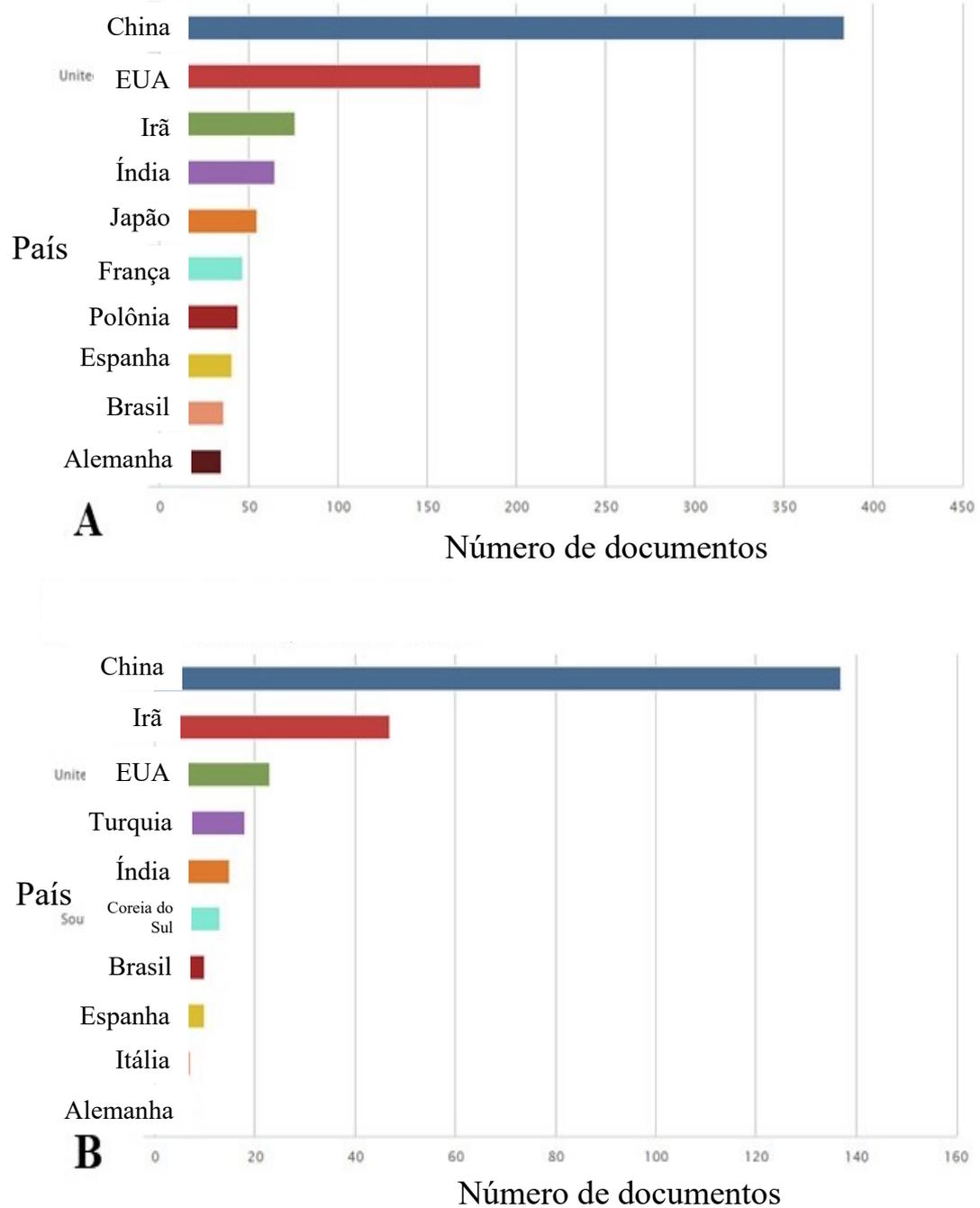
Figura 11 – Evolução do número de trabalhos recuperados nas bases de dados científicas contendo os descritores utilizados.



Busca no portal *Science Direct* (A) e (B); busca no portal *Scielo* (B) e (C) Fonte: autor.

Em busca científica utilizando o termo “*ionic liquid\**” na área de *Agricultural and Biological Sciences* no portal *Scopus*, utilizando o filtro para trabalhos nas áreas de *Agricultural and Biological Sciences* foi possível relacionar outros indicativos a respeito do tema. A revista científica *Food Chemistry* é a que detém o maior número de trabalhos na área. Ainda foi possível observar que a China é o país em que a tecnologia é mais explorada, seguido pelos Estados Unidos e Iran (Figura 12 A e B).

Figura 12 - Distribuição do número de trabalhos envolvendo líquidos iônicos por país.

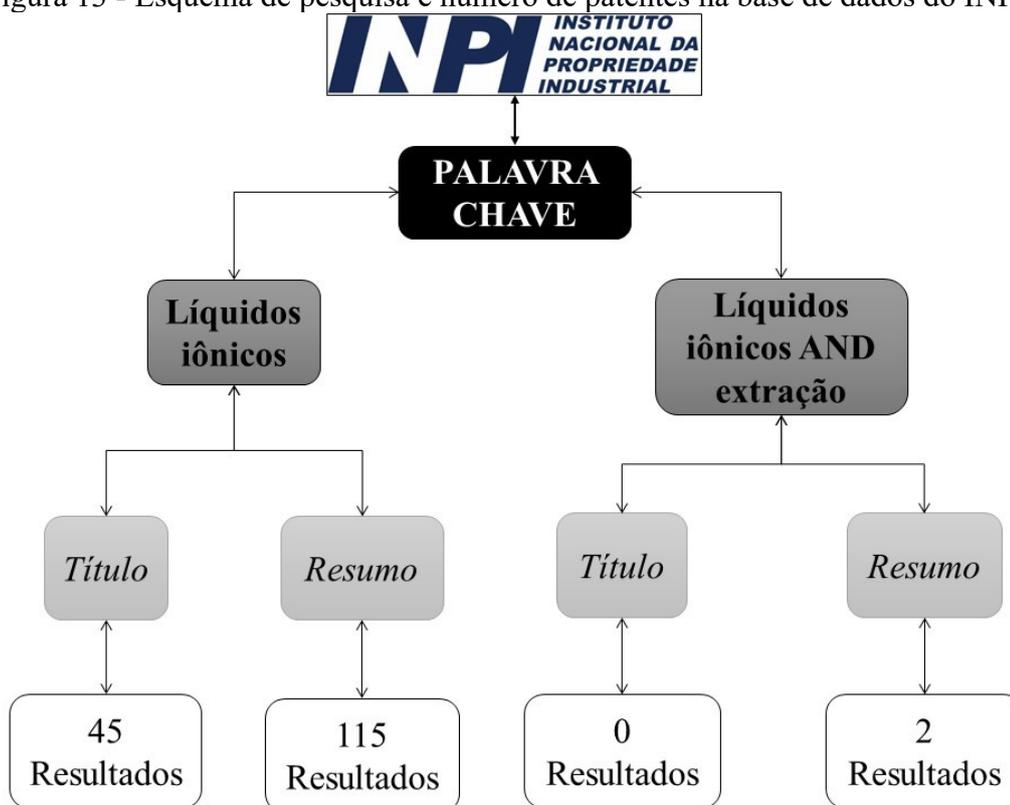


Pesquisa pelo termo “*ionic liquid\**” (A); pesquisa pelo termo “*ionic liquid\* AND extraction*” (B). Fonte: Elsevier (2018).

### 6.1.2 Prospecção Tecnológica

A busca por patentes na base nacional do INPI, retornou resultados diferentes de acordo com o local da pesquisa, os resultados podem ser visualizados na Figura 13.

Figura 13 - Esquema de pesquisa e número de patentes na base de dados do INPI.



Fonte: INPI (2018).

A maioria das patentes recuperadas com líquidos iônicos estavam relacionadas à área de cosmética/higiene pessoal (produção de cremes dentais), e da indústria química (processos de produção de energia na fabricação de baterias).

Algumas patentes relacionavam a utilização de líquidos iônicos em processos de extração, assim como o documento intitulado “Aplicação de líquidos iônicos contendo ânions de triclanometida como solvente para extrair álcoois de soluções aquosas”, “Uso de líquidos iônicos contendo ânions de tetracianoborato como solventes para extração de álcoois a partir de soluções aquosas” e “Aplicação de líquidos iônicos, magnéticos como agente de extração”, porém não foi possível o acesso aos documentos completos.

Ao ser pesquisado o termo “líquidos iônicos” no resumo, foi encontrada uma patente brasileira diretamente relacionada com a área da pesquisa, intitulada “Processo de Obtenção de Carotenoides de Tomates Provenientes de Descarte e Uso de Carotenoides Obtidos” com a titularidade da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), que tratava sobre a utilização do poder extrativo dos líquidos iônicos como solvente verde para extrair carotenoides do resíduo de tomates, para utilização como componente bioativo ou corante natural (ROSSO; MARTINS, 2017).

A pesquisa na base de dados internacional *ESPACENET* foi realizada de maneira a filtrar as patentes que fossem mais específicas da área de estudo do presente trabalho. Primeiramente as buscas foram realizadas somente associando os termos de pesquisa, os quais resultaram em um grande número de patentes relacionadas, mais de 10000 para o termo “*ionic liquid\**” e 858 para o termo “*ionic liquid\* AND extraction*”. Ao associar os termos de pesquisa com os códigos CPC foi recuperado um menor número de patentes, sendo 26 trabalhos ao todo (Tabela 7).

Tabela 7 - Número de trabalhos encontrados na base de dados *ESPACENET*.

Base de Patentes	Código CPC utilizado	Termo Associado Utilizado	Resultados
ESPACENET	Nd	<i>ionic liquid*</i>	>10000
		<i>ionic liquid* AND extraction</i>	858
	B01D11/02	<i>ionic liquid*</i>	3
	B01D11/04	<i>ionic liquid*</i>	15
ESPACENET	B01J8/00	<i>ionic liquid*</i>	1
	B01D11/02	<i>ionic liquid* AND extraction</i>	0
	B01D11/04	<i>ionic liquid* AND extraction</i>	7
	B01J8/00	<i>ionic liquid* AND extraction</i>	0

nd: não disponível. Fonte: autor.

Algumas das patentes encontradas tem relação com o tema do presente trabalho, extração com líquidos iônicos, tal como a patente do método intitulada *Process For Extracting Materials From Biological Material* de 2010, depositada pela Universidade de Leiden, em que a invenção busca a extração de compostos naturais de interesse provenientes de plantas, insetos, animais ou micro-organismos, tais como: flavonoides, antocianinas, compostos fenólicos e corantes, que na maioria das vezes são insolúveis em água, utilizando então líquidos iônicos como substituto aos solventes orgânicos convencionais (SPRONSEN *et al.*, 2014).

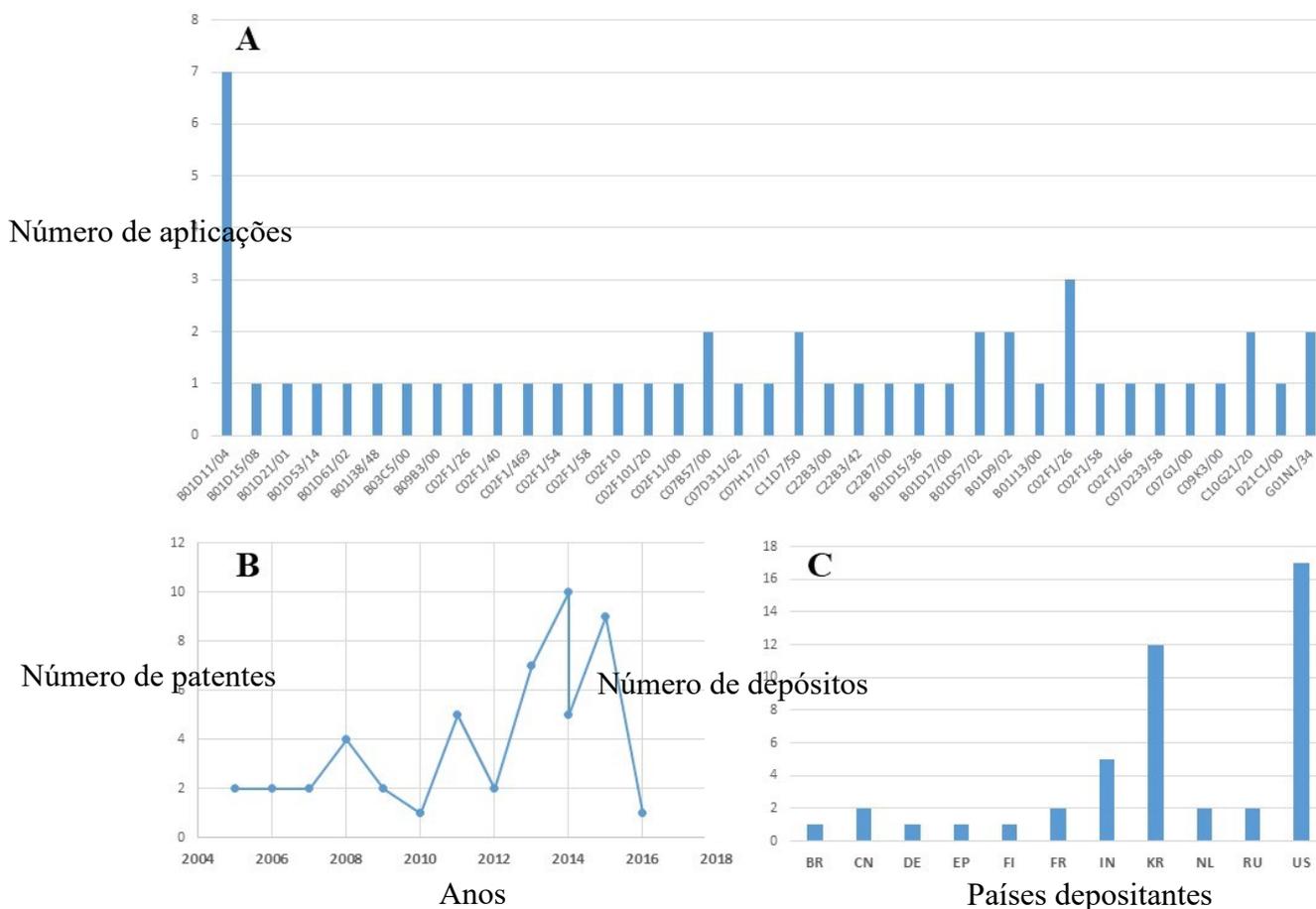
Também pode ser citada a patente *Method For Extracting At Least One Compound From A Liquid Phase Comprising A Functionalized Ionic Liquid, and Microfluidic System For Implementing Said Method* que combina a funcionalidade, praticidade e rapidez dos sistemas de microfluídica com a capacidade extratora que os líquidos iônicos apresentam, criando um sistema de extração de compostos químicos e biológicos de um fase líquida, invenção de Vif Guillaume Delapierre, Seyssinet-Pariset Nicolas Sarrut e Pierre Chatel Gilles Marchand do Comissariado de Energia Atômica da França (DELAPIERRE; SARRUT; MARCHAND, 2011).

Diante do exposto, com os termos pesquisados “*ionic liquid\**” e “*ionic liquid\* AND extraction*” foram recuperados 26 documentos de patente. Os resultados foram agrupados de acordo com a classificação dos números internacionais de patentes, ano e país detentor das invenções e apresentados na Figura 14.

De acordo com os códigos internacionais utilizados nas patentes, foi possível perceber que os mais frequentes foram, B01D11/04 (trata sobre processos de extração de substâncias líquidas) com 7 depósitos; C02F1/26 (trata sobre tratamento de água por extração de compostos) com 3 depósitos; e C07B57/00 (trata sobre reações com formação ou introdução de grupos funcionais contendo hétero átomos), C11D7/50 (trata sobre composição de detergentes químicos), B01D57/02 (trata sobre processos de separação de compostos não sólidos), B01D9/02 (trata sobre processos de separação por cristalização), C10G21/20 (trata sobre refinamento de compostos na ausência de hidrogênio) e G01N1/34 (trata sobre preparo de amostras para investigação) com 2 depósitos cada (Figura 14A).

A maior parte das patentes foi depositada entre os anos 2012 e 2015, quando o movimento da química verde teve crescimento, impactando diretamente no incremento tanto das publicações na área quanto no número das patentes que reivindicavam a temática (SOUSA-AGUIAR *et al.*, 2014) (Figura 14B).

Dentre os países que apresentam mais invenções na área, podemos destacar os Estados Unidos, Coreia do Sul e Índia, que também estão relacionados com os trabalhos científicos publicados sobre o tema (Figura 14C).

Figura 14 - Dados sobre as patentes internacionais – *ESPACENET*.

Códigos internacionais mais utilizados na área (A). Relação anual de patentes depositadas na área (B). Relação de países depositantes das patentes na área (C). Dados: *ESPACENET - European Patent Office*. Fonte: autor.

Os resultados da prospecção tecnológica sobre líquidos iônicos e suas aplicações para extração revelou que ainda existem lacunas na área de extração de compostos de matrizes vegetais, principalmente no que diz respeito às patentes depositadas. Ainda, há uma grande discrepância em relação ao número de trabalhos científicos utilizando LIs em relação a proteção das invenções, o que leva a crer que o incentivo para a pesquisa é muito maior, e que a cultura de proteção de invenções parte principalmente de indústrias e não de centros de pesquisa.

Outro aspecto é a falta de transferência de tecnologia, por apresentar uma grande diferença entre número de trabalhos científicos e invenções, nota-se que o que está disponível em literatura técnica não se transfere ao mercado para gerar riquezas e contribuir para o avanço da sociedade.

Durante as pesquisas foi também possível observar as diferentes aplicações dos líquidos iônicos e seu potencial como solvente inovador, contribuindo para a diminuição da geração de resíduos.

Os resultados indicam que o uso dos líquidos iônicos tem demonstrado cada vez mais potencial, e aliado a novas técnicas de extração, este pode ser um promissor solvente em muitas aplicações.

## 6.2 ETAPA 3

### 6.2.1 Síntese do LI [BMIM][Cl]

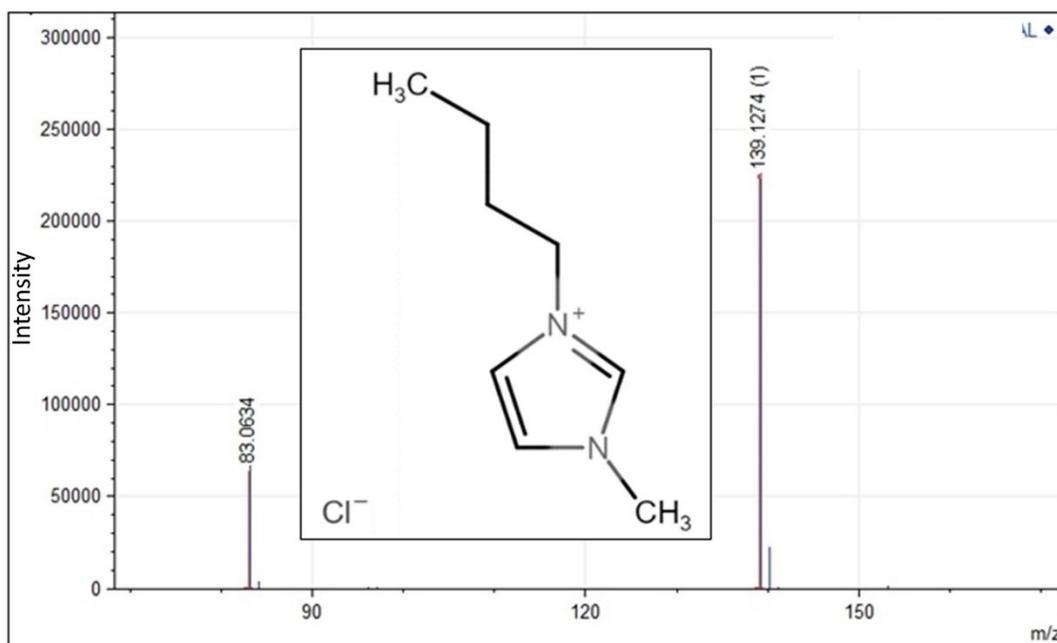
Para confirmar a síntese do LI [BMIM][Cl], foi utilizada uma técnica analítica para obter o padrão de fragmentação MS/MS do composto de interesse, para comparar com a literatura e com a simulação teórica em software MS / MS para o LI sintetizado.

Tendo como base os resultados mencionados, pode-se dizer que a síntese foi bem-sucedida, uma vez que o rendimento médio foi de 98% e o padrão de fragmentação em espectrômetro de massas MS/MS estava de acordo com a literatura e com a simulação teórica (MARTINS; DE ROSSO, 2016). Com uma alta intensidade do íon molecular de massa 139 m/z (100%) ( $C_8H_{15}N_2$ ) o metilimidazólio foi confirmado pela perda de um átomo de cloro [Cl] na estrutura, além do mais a separação do anel imidazol da cadeia alquila pode ser observada no fragmento MS<sup>2</sup> de 83 m/z (28%) ( $C_4H_7N_2$ ) (Figura 15), confirmando assim a síntese do LI [BMIM] [Cl].

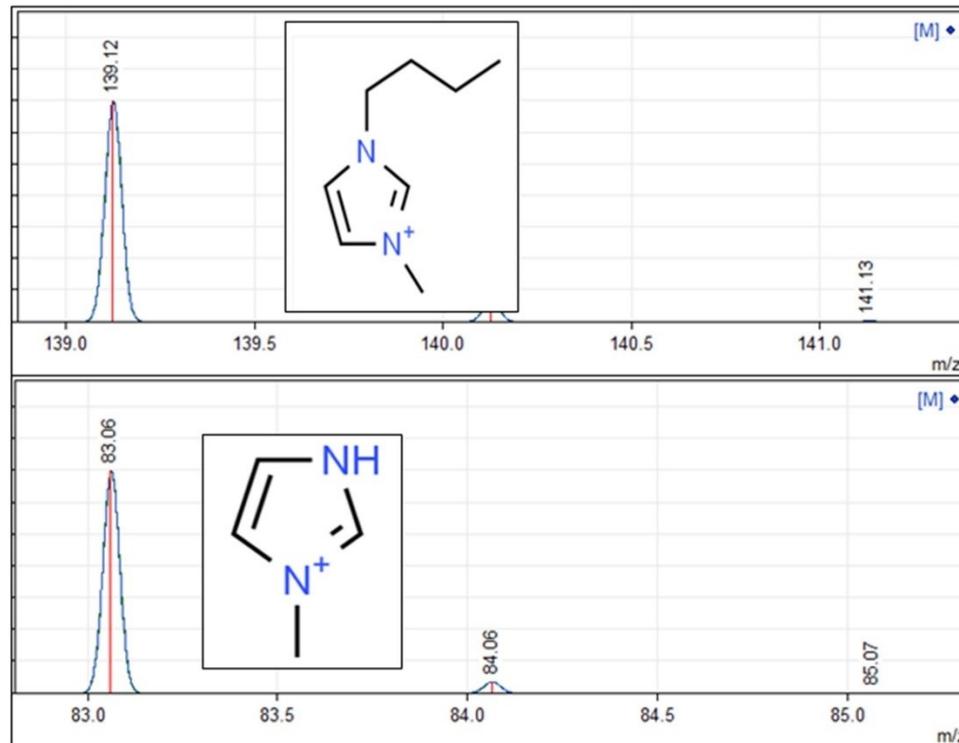
Além disso, a análise do ponto de fusão indicou que em temperatura de aproximadamente 65 °C todo o [BMIM][Cl], anteriormente cristalizado, foi totalmente fundido a líquido, estando de acordo com o ponto de fusão verificado na literatura (SHELDON, R., 2001). A análise do ponto de fusão dos LIs é uma característica atribuída a natureza de diferentes ânions em sua estrutura, sendo que pontos de fusão menores estão relacionados ao aumento do comprimento da cadeia alquil (cadeia lateral) e pontos de fusão maiores estão relacionados a LI contendo cátions simétricos (ZHANG, S. *et al.*, 2006). Portanto, a temperatura de fusão pode ser usada como indicativo rápido da síntese de LI.

Figura 15 - Espectro de massas (MS/MS) do LI [BMIM][Cl] sintetizado.

A



B



A: Espectro de massas do LI [BMIM][Cl]. B: Espectro de massa teórico de acordo com a massa de 139 e 83  $m/z$ .  
Fonte: autor.

No entanto, o ponto de fusão não pode ser utilizado como a principal ou a única ferramenta para verificar a síntese do LI [BMIM][Cl], uma vez que, no equipamento usado para a determinação do ponto de fusão a observação foi visual e não analítica.

### 6.2.2 Extração de compostos fenólicos do resíduo do processamento da goiaba usando LI [BMIM][Cl] assistido por ultrassom

A Tabela 8 apresenta o delineamento fatorial completo  $2^3$  e as respostas de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante para os extratos obtidos via extração assistida com ultrassom utilizando o LI [BMIM][Cl].

Para a escolha dos parâmetros de extração estudados nesta etapa 3, foram levadas em consideração primeiramente as concentrações avaliadas nos trabalhos de Du, Xiao e Li, (2007 e 2011), também como possíveis parâmetros que podem ser alterados quando é utilizado um equipamento de banho de ultrassom.

Tabela 8 - Matriz do planejamento fatorial completo  $2^4$  e resultados das análises do teor de compostos fenólicos totais e potencial antioxidante dos extratos do resíduo do processamento da goiaba.

Ex.	Concentração			Tempo (min)	Temperatura (°C)	Fenólicos totais (mg g <sup>-1</sup> ac. gálico)	Atividade antioxidante (mg g <sup>-1</sup> ac. ascórbico)	
	[BMIM][Cl] (mol L <sup>-1</sup> )							
1	-1	0,40	-1	10	-1	35	1,68 ± 0,18 <sup>c</sup>	3,18 ± 0,22 <sup>cd</sup>
2	+1	2,50	-1	10	-1	35	4,01 ± 0,08 <sup>a</sup>	8,13 ± 0,27 <sup>a</sup>
3	-1	0,40	+1	40	-1	35	1,07 ± 0,07 <sup>gh</sup>	2,72 ± 0,19 <sup>de</sup>
4	+1	2,50	+1	40	-1	35	3,80 ± 0,08 <sup>ab</sup>	8,04 ± 0,46 <sup>a</sup>
5	-1	0,40	-1	10	+1	55	0,90 ± 0,04 <sup>h</sup>	2,17 ± 0,19 <sup>e</sup>
6	+1	2,50	-1	10	+1	55	3,36 ± 0,05 <sup>c</sup>	8,12 ± 0,54 <sup>a</sup>
7	-1	0,40	+1	40	+1	55	1,30 ± 0,05 <sup>fg</sup>	3,61 ± 0,19 <sup>c</sup>
8	+1	2,50	+1	40	+1	55	3,47 ± 0,09 <sup>bc</sup>	8,77 ± 0,36 <sup>a</sup>
9	0	1,45	0	25	0	45	2,58 ± 0,27 <sup>d</sup>	5,83 ± 0,28 <sup>b</sup>
10	0	1,45	0	25	0	45	2,45 ± 0,12 <sup>d</sup>	6,08 ± 0,11 <sup>b</sup>
11	0	1,45	0	25	0	45	2,53 ± 0,24 <sup>d</sup>	6,05 ± 0,42 <sup>b</sup>
Controle CH <sub>3</sub> OH 100%			25		45		1,58 ± 0,40 <sup>ef</sup>	3,65 ± 0,41 <sup>c</sup>

Teste de Tukey (5%) aplicado entre os experimentos (1 ao 11 e controle CH<sub>3</sub>OH). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística.

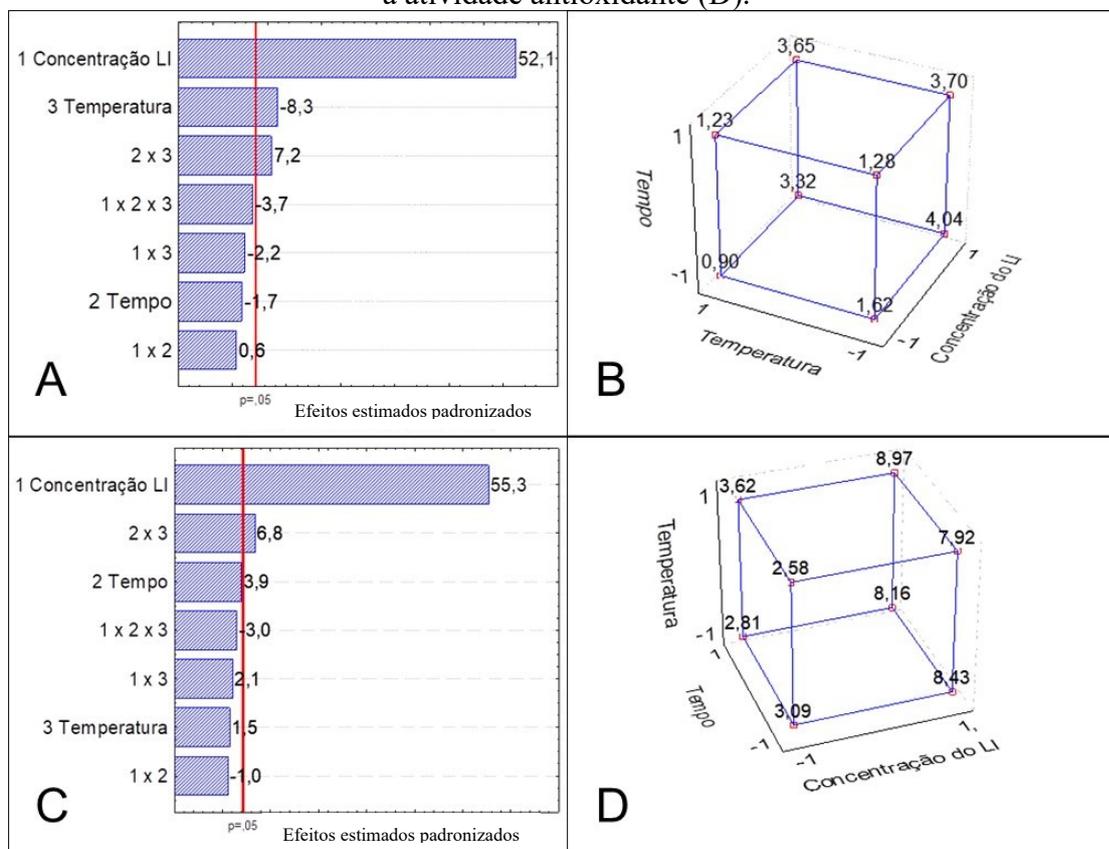
O conteúdo fenólico total dos extratos variou de 0,90 a 4,01 mg g<sup>-1</sup> de ácido gálico. A maior concentração (4,01 mg g<sup>-1</sup> de ácido gálico) foi obtida com 2,5 mol L<sup>-1</sup> de [BMIM][Cl], durante 10 min de extração a 35 °C (experimento 2). Esse resultado foi 2,5 vezes maior, e a extração foi 2,5 vezes mais rápida ( $p < 0,05$ ) usando uma temperatura mais baixa quando comparada à extração com metanol (1,58 mg g<sup>-1</sup> ácido gálico, 25 min a 45 °C). Sousa, Vieira e Lima (2011) relataram menor concentração de compostos fenólicos totais em coproduto de goiaba extraído por infusão (1 h a 25 °C) com água e etanol 80% (entre 0,24 e 0,46 mg g<sup>-1</sup> de ácido gálico, respectivamente). Santos et al. (2017) relataram composição fenólica total para a goiaba fresca inteira de 3,56 mg g<sup>-1</sup> de ácido gálico.

O extrato obtido com 2,5 mol L<sup>-1</sup> de [BMIM][Cl], 40 min a 55 °C (experimento 8) apresentou a maior atividade antioxidante (8,77 mg g<sup>-1</sup> de ácido ascórbico). Esse resultado foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior e 2,4 vezes superior quando comparado à extração com metanol por 25 min a 45 °C como solvente (3,65 mg g<sup>-1</sup> de ácido ascórbico) (Tabela 8). Por outro lado, usando LI [BMIM][Cl] o tempo e a temperatura de extração foram superiores em 1,6 e 1,4 vezes, respectivamente, quando comparados ao controle.

De acordo com o teste de Tukey, o controle utilizando CH<sub>3</sub>OH como solvente, não apresentou diferença estatística ( $p > 0,05$ ) somente em relação aos experimentos 1 e 7 do delineamento experimental para as respostas compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (Tabela 8). Nos experimentos 1 e 7, foi usada a concentração mais baixa de [BMIM][Cl], 0,4 mol L<sup>-1</sup> (nível -1 do planejamento fatorial completo), e obtidos valores de 1,68 e 1,30 mg g<sup>-1</sup> de ácido gálico para composição fenólica total e 3,18 e 3,61 mg g<sup>-1</sup> ácido ascórbico para atividade antioxidante, respectivamente.

A Figura 16A e a Tabela 9 indicam que a concentração do LI e a interação entre tempo e temperatura foram parâmetros positivos e significantes na extração de compostos fenólicos.

Figura 16 - Gráfico de Pareto dos parâmetros para a composição fenólica total (A); Gráfico “Cube Plot” das respostas previstas para a composição fenólica total (B); Gráfico Pareto dos parâmetros para a atividade antioxidante (C); Gráfico “Cube Plot” das respostas previstas para a atividade antioxidante (D).



Fonte: autor

Tabela 9 - Coeficientes de regressão (efeitos estimados) significativos, coeficientes R<sup>2</sup> e R<sup>2</sup><sub>ajustado</sub>, e falta de ajuste do planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> para composição fenólica total e atividade antioxidante.

	Fenólicos totais (Prussian Blue)	Atividade antioxidante (DPPH)
Média	2,47	5,70
[LI]	1,21 (2,42)	2,67 (5,34)
Temperatura	-0,19 (-0,38)	Ns
Tempo × Temperatura	1,17 (0,33)	0,33 (0,66)
R <sup>2</sup>	0,9905	0,9889
R <sup>2</sup> <sub>ajustado</sub>	0,9864	0,9815
Falta de ajuste (α=0,05)	0,17	0,11

Ns: não significativo.

A Figura 17A sugere que um aumento na concentração do LI de 0,4 para 2,5 mol L<sup>-1</sup> (níveis -1 para +1) promove um aumento na resposta da extração dos compostos fenólicos totais. Por outro lado, o efeito da temperatura foi significativo, porém negativo (Figura 16 A), indicando que aumentando a temperatura de extração de 35 para 55 °C ocorre uma redução na extração dos compostos fenólicos totais.

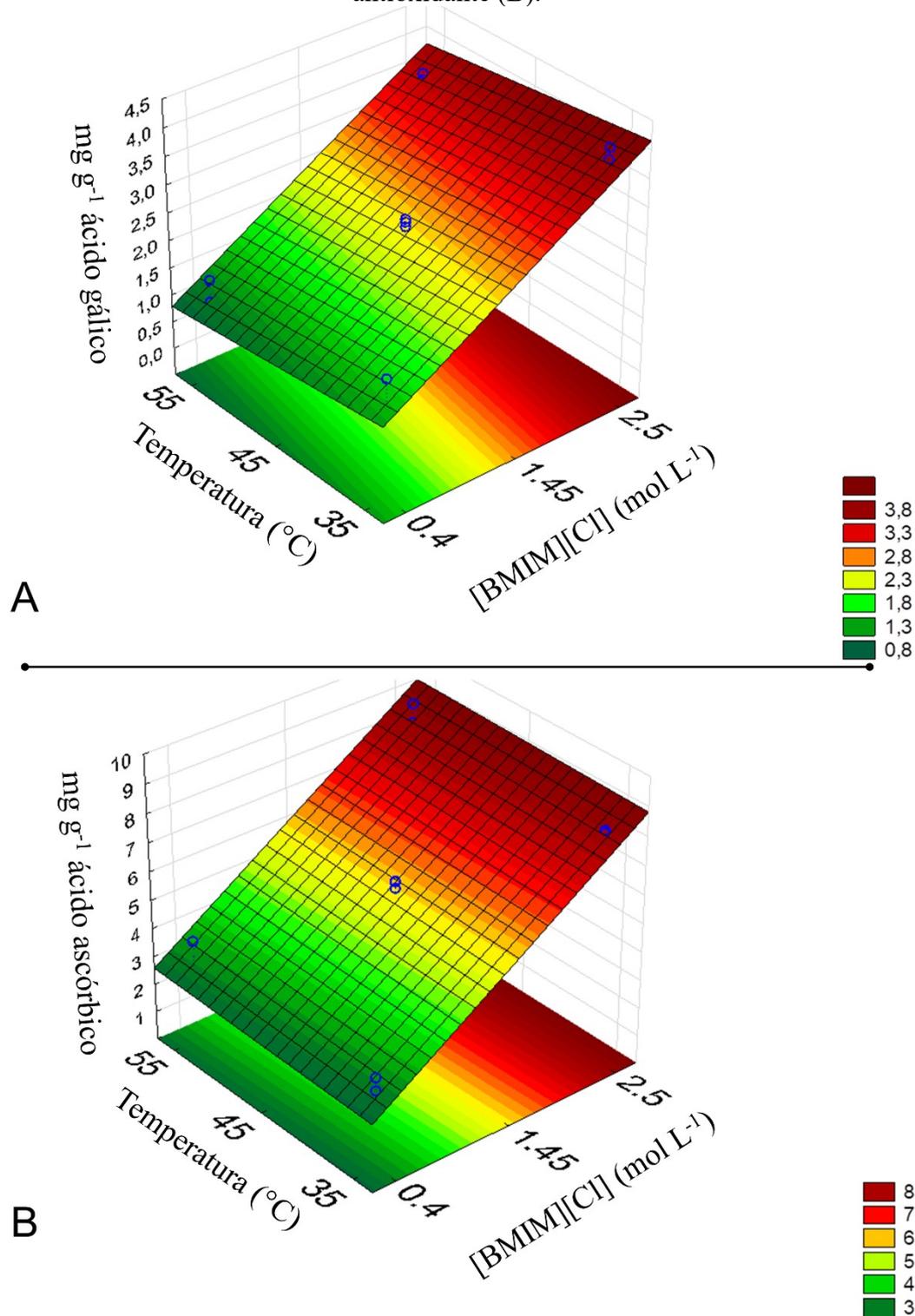
A superfície de resposta para compostos fenólicos totais (Figura 17A) sugere que a extração em baixa temperatura é eficaz para a extração desses compostos. Esse resultado indica que o aumento da temperatura pode degradar os compostos fenólicos que são termolábeis.

Silva et al. (2019) relataram que a temperatura foi um parâmetro significativo na extração de compostos fenólicos totais da fruta Jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) utilizando extração em banho-maria e etanol 60,6% como solvente por 71,93 min. Os autores mostraram uma relação direta entre o aumento da temperatura (de 25 para 65 °C) e a recuperação dos compostos fenólicos totais.

No presente trabalho, a extração dos compostos fenólicos não foi afetada pelo tempo de extração (10, 25 e 40 min). De modo semelhante, Silva et al., (2016) relataram que para a casca da lichia (*Litchi Chinensis* Sonn.) o tempo de extração (30, 45 e 60 min) não foi um parâmetro significativo para a extração de compostos fenólicos totais usando extração assistida por ultrassom com etanol 70% com solvente.

A menor concentração do LI [BMIM] [Cl] (0,40 mol L<sup>-1</sup>), menor tempo de extração (10 min) e maior temperatura (55 °C) foram as condições que promoveram a menor extração de compostos fenólicos totais (0,90 mg ácido g<sup>-1</sup> gálico) (Figura 16 B). Por outro lado, a concentração de LI e a interação entre o tempo de extração e a temperatura mostraram um efeito significativo e positivo na extração de compostos antioxidantes (Figura 16 C). Isso é confirmado com os resultados do DPPH, que indicam que a atividade antioxidante aumenta com o tempo e a temperatura de extração (8,97 mg g<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, (Figura 16 D).

Figura 17 - Superfície de resposta para a composição fenólica total (A) e atividade antioxidante (B).



Fonte: autor

A Figura 17 B indica que o aumento da concentração de LI, aumentou significativamente a atividade antioxidante dos extratos (Figura 16 D). Por outro lado, a

alteração dos parâmetros tempo e temperatura de extração não foram suficientes para alterar significativamente a resposta de atividade antioxidante dos extratos (Figura 16 D).

Guz et al. (2013) relataram que a temperatura de extração (usando etanol 30%, pH 4 e relação amostra/solvente 1:3) apresentou um efeito significativo e positivo na atividade antioxidante do extrato do bagaço de uva, um coproduto do processamento do suco de uva. Os autores indicaram que a maior atividade antioxidante foi obtida utilizando-se uma temperatura de extração de 50 °C, que é próxima à temperatura observada para a maior atividade antioxidante neste trabalho (55 °C).

O modelo estatístico proposto para a extração de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante não apresentou falta de ajuste ( $p > 0,05$ ). Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) de 0,9905 e 0,9889 indicam a precisão do modelo aos dados experimentais em 99% e 98% para compostos fenólicos e atividade antioxidante, respectivamente (Tabela 9).

A Figura 16 (A e C) e a Figura 17 mostram que a concentração do LI [BMIM][Cl] é um parâmetro significativo para a recuperação efetiva de compostos fenólicos do resíduo do processamento da goiaba. Os experimentos 2, 4, 6 e 8 (Tabela 8), utilizando uma solução de 2,5 mol L<sup>-1</sup> de [BMIM][Cl], mostraram respostas de 4,01; 3,80; 3,36 e 3,47 mg g<sup>-1</sup> de ácido gálico, respectivamente. A avaliação do efeito das concentrações nas respostas obtidas foi essencial para o planejamento da etapa 4 deste trabalho.

Kou et al. (2018) avaliaram o efeito de soluções aquosas de tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][BF<sub>4</sub>] (de 0,2 a 2 mol L<sup>-1</sup>) na extração de gingeróis de gengibre usando UAE (25 °C, 10 min). Os autores observaram que a recuperação do composto bioativo alvo foi maior quando as soluções de LI estavam mais concentradas.

Du, Xiao and Li, (2007) avaliaram o efeito de soluções aquosas de [BMIM][BF<sub>4</sub>] e brometo de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][Br] (de 0,5 a 3 mol L<sup>-1</sup>) na extração do *trans*-resveratrol do rizoma de *Polygonum cuspidatum*, usando MAE. Os autores relataram que a concentração de 2,5 mol L<sup>-1</sup> de [BMIM][Br] foi a mais efetiva na recuperação do *trans*-resveratrol. Assim como, Du et al. (2011) relataram que o uso de 2,5 mol L<sup>-1</sup> de [BMIM][Br] com 0,8 mol L<sup>-1</sup> de HCl foi eficaz para a recuperação de miricetina e quercetina de folhas de *Myrica rubra* usando MAE.

Portanto, a utilização do LI na concentração de 2,5 mol L<sup>-1</sup>, demonstrou ser mais efetiva na recuperação de compostos fenólicos, e por este motivo, essa concentração foi usada para os experimentos da etapa seguinte. Outros fatores que não foram estudados na etapa 3, foram investigados na etapa 4, seguido da otimização da extração assistida por LI.

## 6.3 ETAPA 4

### 6.3.1 EXTRAÇÃO COM LÍQUIDOS IÔNICOS ASSISTIDA POR ULTRASSOM (ELIAU) - PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO DE TRIAGEM PARA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A Tabela 10 mostra os parâmetros codificados e reais e os resultados obtidos para os fenólicos totais e atividade antioxidante para os experimentos obtidos no planejamento fatorial completo  $2^4$  com pontos centrais. Os resultados dessa etapa foram inferiores aos obtidos na etapa 3, possivelmente em função de variações instrumentais. As frações aniônicas [Cl] e [BF<sub>4</sub>] dos LIs afetam o rendimento de extração de compostos fenólicos. No entanto, uma longa cadeia alquila pode bloquear os analitos que, para a extração, precisam estar em contato com o anel imidazólio dos LIs, diminuindo a eficiência da extração (BARRULAS; PAIVA; CORVO, 2019; GARAGA; NAYERI; MARTINELLI, 2015).

O tipo e a concentração do ânion presente no LI e sua influência na extração de polifenóis (BARRULAS; PAIVA; CORVO, 2019), compostos fenólicos de própolis (CAO, J. *et al.*, 2017), folhas de bardana (LOU *et al.*, 2012), gingeróis de gengibre (KOU *et al.*, 2018) e lignanas bioativas (MA, C. *et al.*, 2011) tem sido relatado na literatura. Além disso, a concentração de  $2,5 \text{ mol L}^{-1}$ , já foi evidenciada como sendo uma concentração adequada para a obtenção de compostos polifenólicos.

As propriedades de miscibilidade dos LIs estão ligadas ao tipo de ânion escolhido para ser utilizado para cada aplicação, por exemplo, alterando o ânion de um LI o comportamento de extração é afetado devido às mudanças de miscibilidade, podendo potencializar a interação amostra-solvente em meio aquoso (HUDDLESTON *et al.*, 2001; LOU *et al.*, 2012).

Os resultados para a composição fenólica total variaram de 0,05 a 4,07 eq. mg g<sup>-1</sup> ac. gálico levando em consideração a variação nos parâmetros estudados (Tabela 10). O menor valor para composição fenólica total foi observado no experimento 1, no qual foi utilizado o LI [BMIM][Cl] como solvente extrator. A atividade antioxidante avaliada por FRAP apresentou valores variando entre 1,29 e 19,34 eq. mg g<sup>-1</sup> ac. ascórbico (experimento 16), e o mesmo fato ocorreu com o maior resultado (experimento 16) da atividade antioxidante avaliada por DPPH, ambos utilizando o LI [BMIM][BF<sub>4</sub>] como agente extrator, relação amostra/solvente  $30 \text{ g L}^{-1}$ , 40 min de UAE a 55 °C.

A Figura 18 representa o gráfico de pareto dos parâmetros estudados (tipo de LI, relação amostra/solvente, tempo de UAE e temperatura de extração). A curvatura teve influência positiva e significativa na extração dos compostos fenólicos totais (valor de  $p < 0,05$ ),

indicando que os fatores utilizados no processo de extração estão próximos da extração fenólica máxima (Figura 18A).

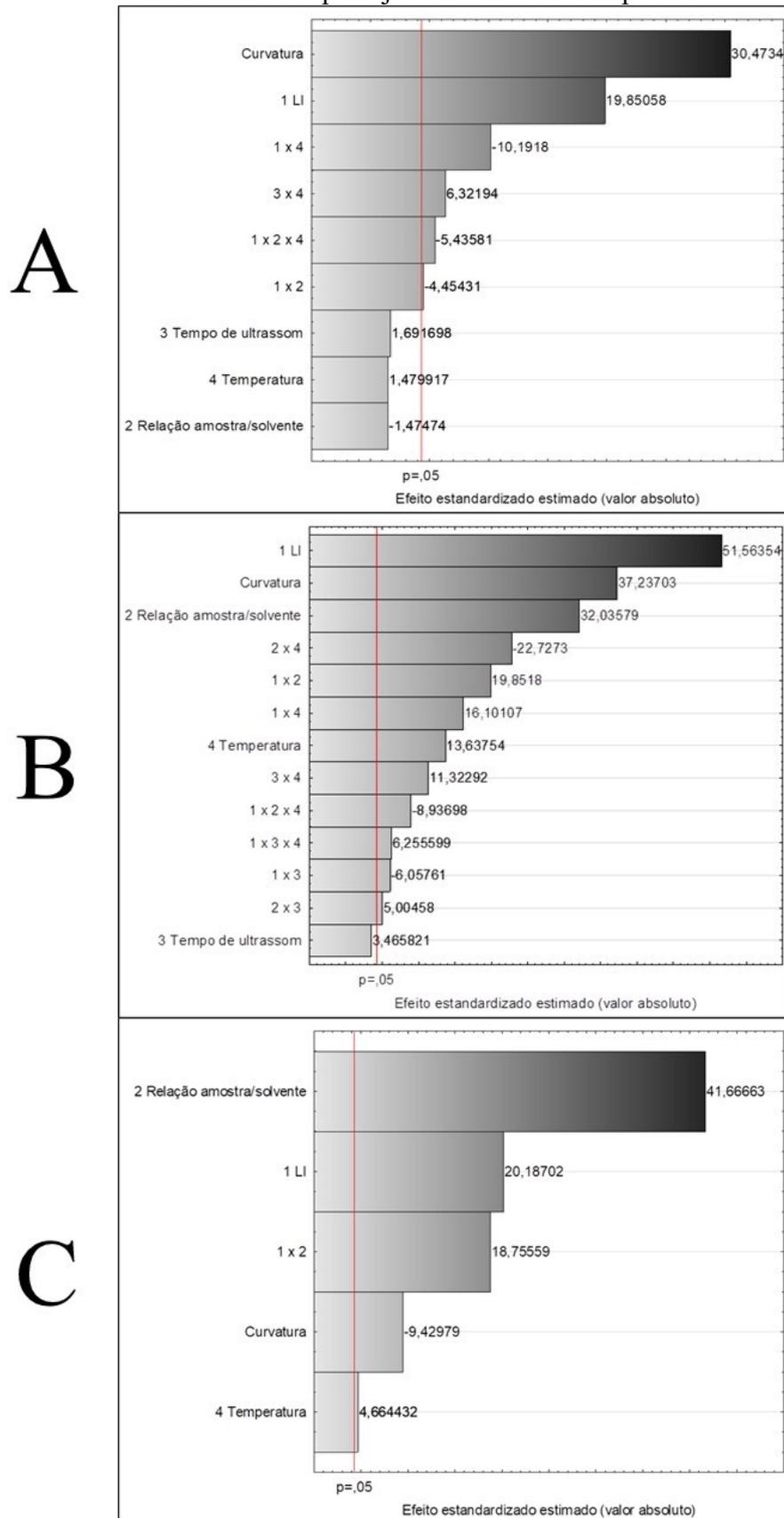
Por outro lado, quando o tempo de extração em ultrassom, a temperatura e a razão amostra/solvente são considerados individualmente, estes não contribuíram de forma significativa na extração de compostos fenólicos totais (Figura 18 A). Porém, a interação entre o tempo de extração em ultrassom e a temperatura indica que juntos, os dois parâmetros foram significativos.

Tabela 10 - Parâmetros reais e codificados do planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup> com as respostas de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante

Ex.	LI	Razão amostra/solvente (g/L)	Tempo de ultrassom (min)	Temperatura (°C)	Fenólicos totais		Atividade antioxidante				
					(eq. mg g <sup>-1</sup> ac. galico)*	FRAP (eq. mg g <sup>-1</sup> ac. ascórbico)*	DPPH (INibição/massa amostra)*				
1	-1	[BMIM][Cl]	+1	100	-1	10	-1	35	0,61±0,02	2,51±0,09	749±1
2	+1	[BMIM][BF <sub>4</sub> ]	+1	100	-1	10	-1	35	2,35±0,04	5,74±3,16	813±2
3	-1	[BMIM][Cl]	-1	30	-1	10	-1	35	0	5,95±0,05	1118±2
4	+1	[BMIM][BF <sub>4</sub> ]	-1	30	-1	10	-1	35	2,7±0,18	19,27±0,55	2067±11
5	-1	[BMIM][Cl]	+1	100	+1	40	-1	35	0,05±0,01	2,22±0,12	782±3
6	+1	[BMIM][BF <sub>4</sub> ]	+1	100	+1	40	-1	35	2,29±0,04	1,29±0,11	750±8
7	-1	[BMIM][Cl]	-1	30	+1	40	-1	35	0,25±0,03	7,78±0,23	1115±32
8	+1	[BMIM][BF <sub>4</sub> ]	-1	30	+1	40	-1	35	1,80±0,06	16,73±0,07	2047±4
9	-1	[BMIM][Cl]	+1	100	-1	10	+1	55	0,42±0,03	3,41±0,14	784±4
10	+1	[BMIM][BF <sub>4</sub> ]	+1	100	-1	10	+1	55	1,92±0,27	13,24±0,86	819±1
11	-1	[BMIM][Cl]	-1	30	-1	10	+1	55	0,86±0,08	2,43±0,01	1309±6
12	+1	[BMIM][BF <sub>4</sub> ]	-1	30	-1	10	+1	55	1,14±0,09	15,99±0,60	1966±10
13	-1	[BMIM][Cl]	+1	100	+1	40	+1	55	1,03±0,01	5,24±0,14	768±1
14	+1	[BMIM][BF <sub>4</sub> ]	+1	100	+1	40	+1	55	2,2±0,06	15,09±0,40	822±2
15	-1	[BMIM][Cl]	-1	30	+1	40	+1	55	1,81±0,03	5,66±0,43	1495±12
16	+1	[BMIM][BF <sub>4</sub> ]	-1	30	+1	40	+1	55	1,49±0,13	19,34±1,48	2276±57
17	0	[BMIM][Cl]/[BMIM][BF <sub>4</sub> ]	0	65	0	25	0	45	3,80±0,06	16,64±0,15	928±1
18	0	[BMIM][Cl]/[BMIM][BF <sub>4</sub> ]	0	65	0	25	0	45	4,07±0,05	16,99±0,27	1002±1
19	0	[BMIM][Cl]/[BMIM][BF <sub>4</sub> ]	0	65	0	25	0	45	3,92±0,08	17,34±0,13	1002±2

\*Média ± desvio padrão. N=2. Fonte: próprio autor.

Figura 18 - Gráficos de Pareto dos parâmetros analisados para as respostas de fenólicos totais e atividade antioxidante do planejamento fatorial completo  $2^4$ .



A: Fenólicos totais (*Prussian Blue*). B: Atividade antioxidante (FRAP). C: Atividade antioxidante (DPPH).

Fonte: autor.

Os parâmetros significativos avaliados no planejamento fatorial completo para a atividade antioxidante são representados na Figura 18 B e C. Os resultados da atividade antioxidante pelo método de FRAP indicam que os principais fatores significativos e positivos, que aumentam o efeito com o incremento do nível do parâmetro, foram o tipo de LI, curvatura e relação amostra/solvente. Além disso, a interação entre o tipo de LI e a relação amostra/solvente foi o principal efeito positivo sobre a AA pelo método FRAP (Figura 18 B).

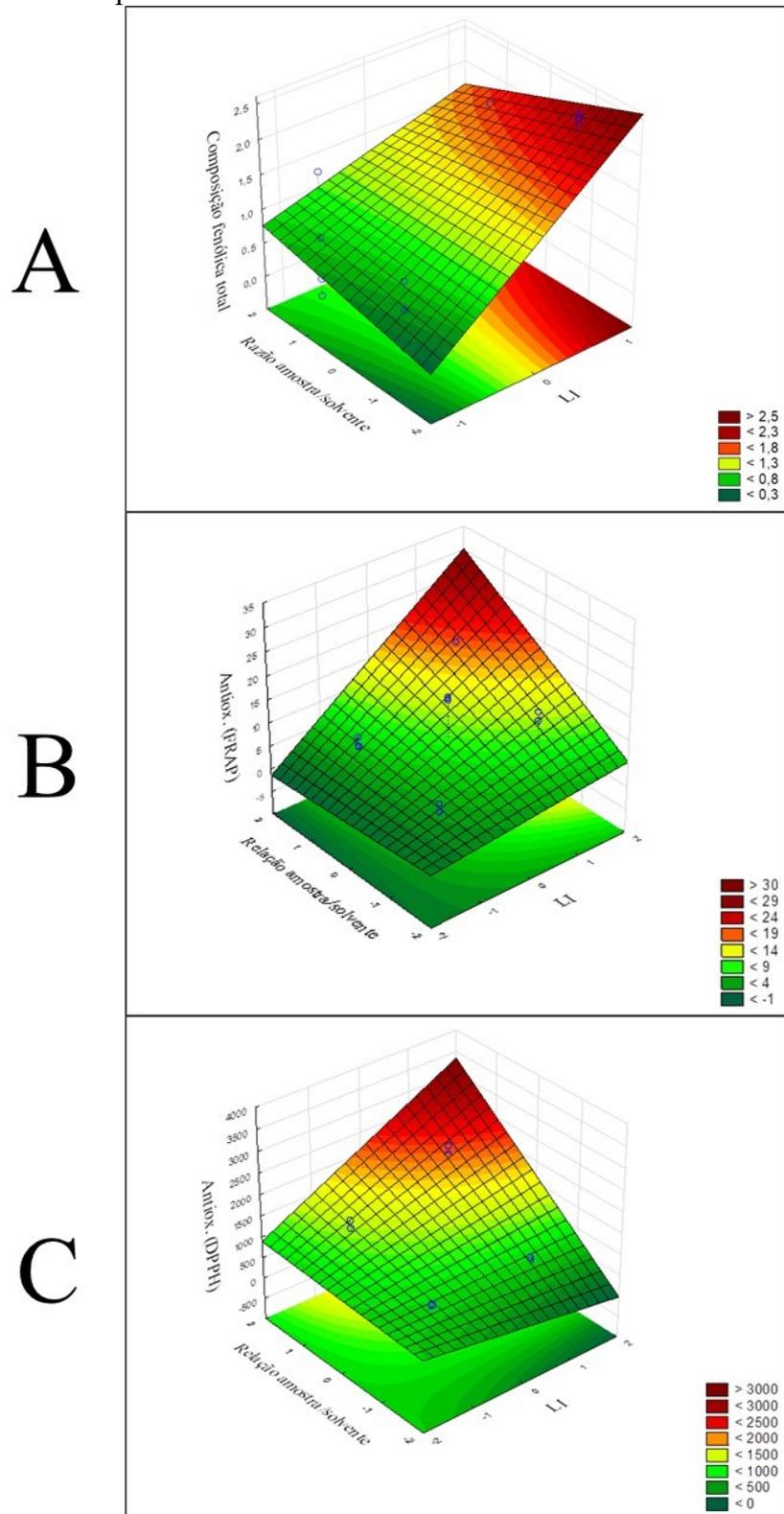
A relação amostra/solvente, o tipo de LI e a interação entre ambos são estatisticamente significativos na extração de compostos com potencial antioxidante pelos métodos FRAP (Figura 18 B) e DPPH (Figura 18 C). Os resultados indicam a capacidade do [BMIM][BF<sub>4</sub>] (nível +1) na recuperação desses compostos.

As respostas de fenólicos totais, FRAP e DPPH tiveram o tipo de LI como parâmetro significativo na extração de compostos fenólicos com potencial antioxidante. É possível observar na Figura 19 A, B e C o efeito combinado do tipo de LI e razão sólido-líquido quando a temperatura e o tempo de UAE permanecem no ponto central (25 min a 45 °C).

A Figura 19 A mostra que a extração de compostos fenólicos totais usando LI [BMIM][BF<sub>4</sub>] é maior quando comparada a [BMIM][Cl] (experimentos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 6 (Tabela 10). Cao *et al.*, (2009) relataram que a UAE (30 min, 500 W) usando o LI [BMIM][BF<sub>4</sub>] (2 mol L<sup>-1</sup>) foi adequada para a extração de piperina de pimenta branca (*Piper nigrum* L.). O LI [BMIM][BF<sub>4</sub>], 1,5 mol L<sup>-1</sup>, também foi eficiente na extração por micro-ondas (90 s, 280 W) de alcaloides fenólicos de ervas da medicina chinesa (LU *et al.*, 2008).

O tempo de UAE e a temperatura de extração, que foram os parâmetros não significativos para a extração, foram fixados no ponto central (25 min a 45 °C). Por outro lado, os parâmetros tipo de LI e razão sólido-líquido foram otimizados usando um planejamento DCCR 2<sup>2</sup>, com metodologia de superfície de resposta e função de desejabilidade (Tabela 11).

Figura 19 - Superfícies de resposta do planejamento fatorial completo  $2^4$ , destacando os parâmetros LI e razão amostra/solvente.



A: composição fenólica total. B: atividade antioxidante (FRAP). C: atividade antioxidante (DPPH). Fonte: autor.

### 6.3.2 Otimização ELIAU por metodologia de superfície de resposta

A Tabela 11 mostra o efeito sinérgico da variação do tipo de LI e da razão amostra/solvente na resposta de fenólicos totais extraídos do resíduo do processamento da goiaba utilizando a metodologia DCCR, com RSM e função desejabilidade.

A maior extração de compostos polifenólicos (1,74 mg g<sup>-1</sup> gálico) foi obtida utilizando 50% de [BMIM][BF<sub>4</sub>]. Para o potencial antioxidante avaliado por ambos os métodos, os maiores valores (experimento 7 para DPPH e 3 para FRAP) foram associados ao uso de pelo menos 50% de [BMIM][BF<sub>4</sub>]. As três respostas indicaram que o [BMIM][BF<sub>4</sub>] é o melhor LI quando comparado ao [BMIM][Cl], que apresentou os menores valores para as três respostas no experimento 5 (não detectado para PC, 357 IN para DPPH e 1,40 mg g<sup>-1</sup> ac ascórbico para FRAP) (Tabela 11).

Tabela 11 - Parâmetros reais e codificados do planejamento DCCR 2<sup>2</sup> para a extração de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante.

Ex.	LI		Razão amostra/solvente (g/L)	Fenólicos totais		Atividade antioxidante	
	[BMIM][BF <sub>4</sub> ] e [BMIM][Cl] <sup>#</sup>			(eq. mg g <sup>-1</sup> ac. gálico)*		DPPH (inibição normalizada)*	FRAP (eq. mg g <sup>-1</sup> ac. ascórbico)*
1	-1	15	-1	20	0,11±0,03	1844±109	8,34±0,68
2	-1	15	1	90	0,34±0,04	677±2	3,73±0,10
3	1	85	-1	20	0,75±0,03	2369±203	15,69±1,01
4	1	85	1	90	0,84±0,03	904±40	6,65±0,57
5	-1,41	0	0	55	0	357±23	1,40±0,17
6	1,41	100	0	55	1,02±0,03	1297±5	8,71±0,64
7	0	50	-1,41	5	0	2567±14	15,32±1,61
8	0	50	1,41	104	1,19±0,07	765±7	6,26±1,05
9	0	50	0	55	1,65±0,07	1060±36	4,55±0,60
10	0	50	0	55	1,74±0,08	1038±53	4,36±0,71
11	0	50	0	55	1,59±0,01	1198±125	6,64±0,73

<sup>#</sup> Valores referentes a % de [BMIM][BF<sub>4</sub>], o LI [BMIM][Cl] foi utilizado até atingir 100%. \* Média ± desvio-padrão. N=3. Fonte: autor.

O coeficiente linear para os parâmetros LI e relação amostra/solvente mostrou um efeito positivo, indicando que o aumento de [BMIM][BF<sub>4</sub>] e relação amostra/solvente aumentam a extração do teor de fenólicos totais. Por outro lado, não houve interações significativas entre o tipo de LI e a relação amostra/solvente. No entanto, de acordo com os coeficientes quadráticos negativos para relação amostra/solvente (-0,54) e tipo de LI (-0,58), há

uma diminuição na resposta dos compostos fenólicos totais ao aumentar o nível desses dois parâmetros (Tabela 12).

A precisão do modelo previsto para os dados experimentais para cada resposta foi verificada pelo coeficiente de determinação ( $R^2$  e  $R^2_{ajustado}$ ) que indica a correlação entre os dados experimentais e o modelo previsto para a composição fenólica total e atividade antioxidante (DPPH e FRAP). Além disso, o modelo proposto não apresentou falta de ajuste ( $p > 0,05$ ) para nenhuma resposta (Tabela 12).

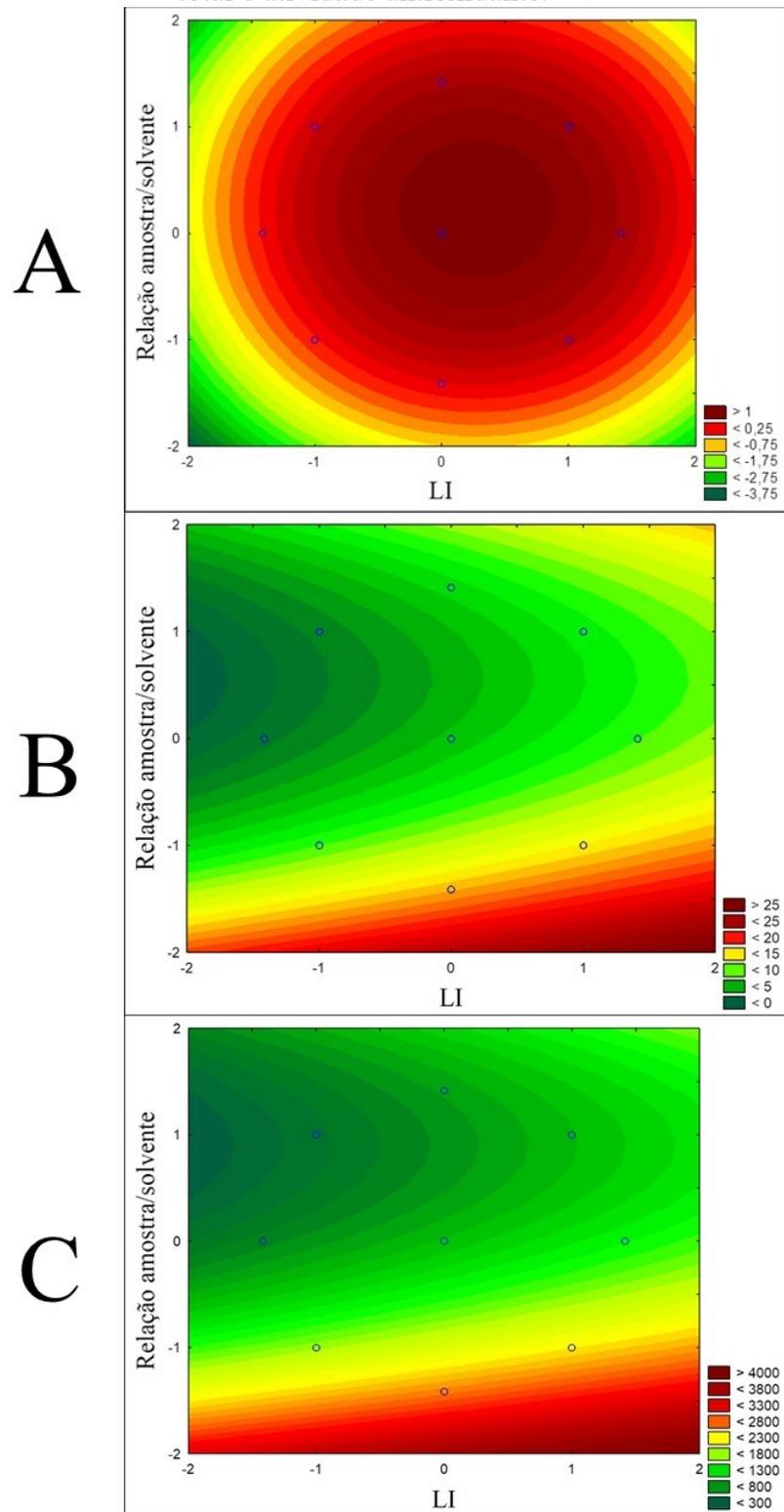
Tabela 12 – Coeficientes de regressão (efeitos estimados), coeficientes  $R^2$  e  $R^2_{ajustado}$ , e falta de ajuste do planejamento DCCR 2<sup>2</sup> para composição fenólica total e atividade antioxidante.

	Fenólicos totais	Atividade antioxidante	
	<i>Prussian Blue</i>	DPPH	FRAP
Média	1,66	1018,31	5,28
LI	0,32 (0,65)	260,26 (520,52)	2,58 (5,15)
LI <sup>2</sup>	-0,58 (-1,17)	Ns	Ns
Razão amostra/solvente	0,25 (0,5)	-647,58 (-1295,16)	-3,30 (-6,61)
Razão amostra/solvente <sup>2</sup>	-0,54 (-1,08)	359,37 (718,74)	2,94 (5,88)
$R^2$	0,9401	0,9586	0,9548
$R^2_{ajustado}$	0,9002	0,9408	0,9355
Falta de ajuste ( $\alpha=0.05$ )	0,07	0,17	0,65

Ns: não significativa. Fonte: próprio autor.

A Tabela 12 e a Figura 20 B e C mostram que ao diminuir a porcentagem do LI com o ânion [Cl], o potencial antioxidante aumenta. Esses resultados indicam uma relação indireta entre o uso do ânion [Cl] e a extração de compostos com potencial antioxidante. Além disso, os gráficos de superfície (Figura 20 B e C) são semelhantes para valores baixos da relação amostra/solvente indicando que uma pequena quantidade de amostra é suficiente para recuperar compostos com potencial antioxidante. Lima et al. (2019) e Sousa, Vieira e Lima (2011) também relataram que pequenas quantidades do resíduo do processamento da goiaba foram suficientes para obter extratos ricos em compostos antioxidantes. Além disso, tanto a análise de DPPH quanto a de FRAP mostraram um alto potencial antioxidante usando [BMIM][BF<sub>4</sub>] como solvente.

Figura 20 – Superfícies de contorno do planejamento DCCR 2<sup>2</sup> para a composição fenólica total e atividade antioxidante.

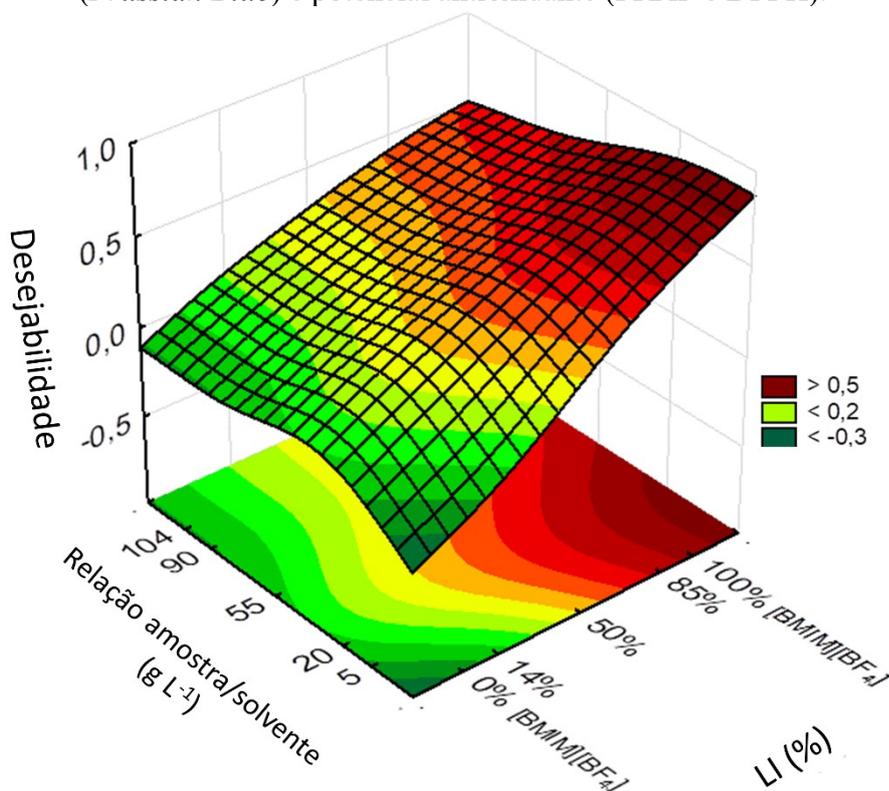


A: Composição fenólica total. B: Atividade antioxidante (FRAP). C: Atividade antioxidante (DPPH). Fonte: autor.

A função desejabilidade foi usada para obter os níveis de cada parâmetro que promovem a condição máxima de extração para respostas simultâneas (fenólicos totais e

atividade antioxidante por FRAP e DPPH), alcançando a otimização do processo de extração. De acordo com a Figura 21, que representa a superfície de resposta da função desejabilidade, a alteração de nível (0%–100% de [BMIM][BF<sub>4</sub>]) do fator LI (-1,41 para 1,41) promove um aumento no índice de desejabilidade (que varia de 0 a 1); além disso, baixos níveis do parâmetro razão amostra/solvente também pode melhorar o desempenho da extração, e conseqüentemente o índice de desejabilidade.

Figura 21 - Superfície de resposta da função desejabilidade para composição fenólica total (*Prussian Blue*) e potencial antioxidante (FRAP e DPPH).



Fonte: autor.

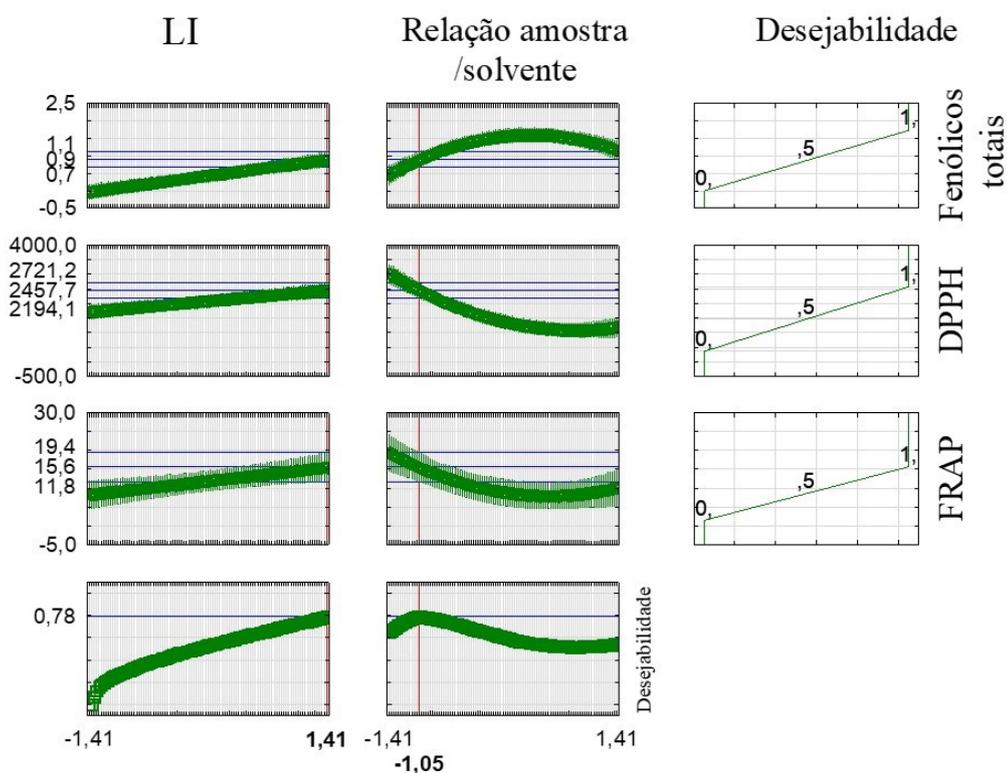
Para validar o índice fornecido pela função desejabilidade, as predições das respostas foram analisadas (Tabela 13), ou seja, o valor médio predito e o valor médio experimental, referente a um mesmo intervalo de confiança de  $\pm 95\%$  associado a cada média. Todos os valores experimentais das três respostas se sobrepuseram aos valores preditos (considerando o intervalo de 95% de confiança), confirmando, conseqüentemente, a precisão da função desejabilidade.

Tabela 13 – Índice de desejabilidade, valores preditos da função desejabilidade e valores experimentais para as respostas avaliadas.

	Respostas		
	Fenólicos totais (eq. mg g <sup>-1</sup> ac. gálico)*	DPPH (inibição normalizada)*	FRAP (eq. mg g <sup>-1</sup> ac. ascórbico)*
Valor médio predito	0,89	2457,65	15,61
- 95 % predição	0,68	2194,12	11,76
+ 95 % predição	1,1	2721,18	19,46
Valor experimental	1,17	2113,56	20,71
- 95 % confiança	0,97	1581,99	18,87
+ 95 % confiança	1,37	2645,13	22,55
Índice de desejabilidade	0,78		

A função desejabilidade representada na Figura 22 apontou que os valores otimizados reais foram LI 100 % de [BMIM][BF<sub>4</sub>] (+1,41) e razão amostra/solvente de 20 g L<sup>-1</sup> (-1,05).

Figura 22 - Gráficos da função desejabilidade indicando o ponto ótimo dos parâmetros LI e razão amostra/solvente.



Fonte: autor.

Assim, a seguinte condição de extração otimizada foi usada para análises posteriores: razão amostra/solvente de 20 g L<sup>-1</sup> de resíduo de goiaba extraídas usando 100 % de uma solução aquosa de 2,5 mol L<sup>-1</sup> do LI [BMIM][BF<sub>4</sub>] (condições otimizadas pela função desejabilidade), extraídos durante 25 min em ultrassom a 45 °C (condições avaliadas no planejamento de triagem e mantidas no ponto central).

### **6.3.3 ELIAU e extração com VOS para obtenção de compostos fenólicos com atividade antioxidante**

As condições de ELIAU otimizadas para a extração de fenólicos e avaliação da atividade antioxidante a partir do resíduo do processamento da goiaba foram aplicadas também para a extração com solventes tradicionalmente utilizados. Os resultados dessas extrações são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante do extrato do resíduo do processamento da goiaba obtidos por ELIAU e outros solventes.

	Fenólicos				Atividade antioxidante					
	Conteúdo fenólico total (eq. mg g <sup>-1</sup> ac. gálico)*	Flavonois totais (eq. mg g <sup>-1</sup> quercetina)*	Taninos condensados (eq. mg g <sup>-1</sup> catequina)*	Orto-difenóis (eq. mg g <sup>-1</sup> ac. cafeico)*	DPPH (eq. mg g <sup>-1</sup> ac. ascórbico)*	ABTS (eq. mg g <sup>-1</sup> Trolox)*	FRAP (eq. mg g <sup>-1</sup> ac. ascórbico)*	Inibição da peroxidação lipídica (%)*	Inibição do complexo Fe <sup>2+</sup> -ferrozina (%)*	Inibição do complexo Cu <sup>2+</sup> -pirocatecol (%)*
ELIAU	1,18±0,08 <sup>f</sup>	0,15±0,02 <sup>c</sup>	6,44±0,43 <sup>a</sup>	1,76±0,19 <sup>a</sup>	14,28±1,61 <sup>a</sup>	43,60±4,25 <sup>a</sup>	20,71±1,76 <sup>a</sup>	27,91±2,25 <sup>c</sup>	19,12±0,88 <sup>d</sup>	68,60±0,73 <sup>a</sup>
Etanol 50%	4,53±0,44 <sup>b</sup>	0,02±0,00 <sup>d</sup>	5,35±0,58 <sup>b</sup>	0,62±0,08 <sup>c</sup>	16,58±1,28 <sup>a</sup>	32,02±1,72 <sup>b</sup>	15,31±0,72 <sup>b</sup>	25,21±1,40 <sup>c</sup>	36,30±2,87 <sup>b</sup>	34,88±2,03 <sup>d</sup>
Etanol 80%	2,35±0,21 <sup>de</sup>	0,14±0,01 <sup>c</sup>	2,81±0,08 <sup>d</sup>	0,33±0,09 <sup>d</sup>	7,77±0,73 <sup>c</sup>	14,23±0,66 <sup>c</sup>	3,80±0,37 <sup>d</sup>	34,12±0,29 <sup>b</sup>	40,09±1,41 <sup>b</sup>	29,16±1,54 <sup>f</sup>
Etanol 100%	0,94±0,06 <sup>f</sup>	0,57±0,02 <sup>a</sup>	2,68±0,21 <sup>d</sup>	1,45±0,03 <sup>ab</sup>	1,31±0,11 <sup>c</sup>	5,42±0,55 <sup>g</sup>	1,58±0,58 <sup>d</sup>	10,47±0,78 <sup>e</sup>	27,86±1,86 <sup>c</sup>	43,05±0,68 <sup>c</sup>
Metanol 50%	5,15±0,19 <sup>a</sup>	ND	5,00±0,11 <sup>b</sup>	ND	16,32±0,15 <sup>a</sup>	31,32±0,49 <sup>b</sup>	13,72±1,26 <sup>b</sup>	38,58±1,86 <sup>a</sup>	39,78±1,86 <sup>b</sup>	33,46±1,30 <sup>de</sup>
Metanol 80%	2,87±0,13 <sup>d</sup>	0,01±0,00 <sup>d</sup>	3,07±0,20 <sup>cd</sup>	ND	10,15±0,57 <sup>b</sup>	19,33±0,73 <sup>cd</sup>	7,59±0,70 <sup>c</sup>	14,36±0,16 <sup>d</sup>	46,13±1,67 <sup>a</sup>	31,33±0,68 <sup>def</sup>
Metanol 100%	2,08±0,22 <sup>c</sup>	0,44±0,04 <sup>b</sup>	ND	1,33±0,10 <sup>b</sup>	5,29±0,42 <sup>d</sup>	10,26±0,79 <sup>f</sup>	3,56±0,37 <sup>d</sup>	11,26±1,46 <sup>de</sup>	20,82±1,39 <sup>d</sup>	19,49±0,95 <sup>g</sup>
Água	3,76±0,29 <sup>c</sup>	ND	3,49±0,41 <sup>cd</sup>	ND	10,43±0,50 <sup>b</sup>	20,39±0,63 <sup>c</sup>	7,28±0,49 <sup>c</sup>	2,02±0,27 <sup>f</sup>	25,93±1,63 <sup>c</sup>	30,81±1,04 <sup>ef</sup>
Água acidificada	3,60±0,29 <sup>c</sup>	ND	3,87±0,42 <sup>c</sup>	ND	8,87±0,18 <sup>bc</sup>	17,05±0,63 <sup>d</sup>	6,53±0,52 <sup>c</sup>	26,34±1,86 <sup>c</sup>	10,68±0,75 <sup>c</sup>	61,17±1,91 <sup>b</sup>

\* Média ± desvio-padrão. N= 3. Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa entre os solventes de acordo com o teste de Tukey (5%). ND: não detectado.

Os maiores valores de compostos fenólicos totais foram observados quando utilizados metanol a 50 % e etanol a 50 % ao invés dos solventes puros (Tabela 14), concordando com o indicado por Ismail et al. (2019), os quais relatam que soluções de metanol e etanol a 30, 50 e 80% foram melhores que os solventes puros na extração do conteúdo fenólico total da polpa da fruta Baobá (*Adansonia digitata*).

O conteúdo fenólico total (Tabela 14) obtido por ELIAU (1,18 mg g<sup>-1</sup>) foi semelhante ( $p > 0,05$ ) ao obtido com etanol 100% (0,94 mg g<sup>-1</sup>),

Sousa, Vieira e Lima (2011) relataram valores inferiores para a composição fenólica total em coproduto de goiaba usando água e etanol como solventes de extração (0,24 e 0,46 mg g<sup>-1</sup> de ácido gálico, respectivamente). Por outro lado, resultados semelhantes para compostos fenólicos do coproduto de goiaba usando UAE com água foram relatados por Melo et al. (2011). Entretanto, nos estudos citados anteriormente, a análise de composição fenólica total foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu. Essa técnica tem sido relatada com baixa especificidade para este método. No entanto, o método do *Prussian Blue*, que foi utilizado neste estudo, mostra-se com maior reprodutibilidade, repetitividade e com seletividade superior à abordagem anterior (MARGRAF et al., 2015).

Resultado superior (2,53 eq. mg g<sup>-1</sup> ac. gálico) ao do presente trabalho também foi relatado por Casarotti et al. (2018) que usaram o resíduo do processamento da goiaba para produzir uma bebida fermentada.

Silva e Jorge (2014) relataram 0,27 eq. mg g<sup>-1</sup> de ácido gálico para óleo de semente de goiaba em extrato metanólico obtido por extração a frio indicando que mesmo a semente do coproduto de goiaba também possui quantidades consideráveis de compostos fenólicos. García-Betanzos et al. (2017) relataram um conteúdo de compostos fenólicos totais de 1,02 eq. mg g<sup>-1</sup> de ácido gálico para a goiaba inteira. Ainda, em outro estudo, considerando a goiaba fresca, uma concentração de fenólicos totais de 3,56 eq. mg g<sup>-1</sup> de ácido gálico, também em extrato metanólico, foi demonstrado por Santos et al. (2017). Com base no estudo avaliando a goiaba fresca, é possível sugerir que cerca de 33% (segundo resultados do método ELIAU) de compostos fenólicos permanecem no resíduo do processamento, sendo então uma fonte potencial de compostos bioativos.

A concentração de flavonóis totais (0,15 eq. mg g<sup>-1</sup> de quercetina) para os extratos obtidos por ELIAU foi semelhante aos extratos obtidos com etanol 80% (0,14 eq. mg g<sup>-1</sup> de quercetina) e superior a todos os solventes tradicionais, exceto para etanol e metanol 100% (0,57 e 0,44 eq. mg g<sup>-1</sup> de quercetina, respectivamente). Esses resultados foram três vezes superiores aos flavonóis totais no extrato obtido por ELIAU (Tabela 14). Etanol e metanol têm

sido relatados como solventes frequentemente utilizados para obter extratos ricos em flavonóis como a quercetina (KO *et al.*, 2011). Rojas-Garbanzo *et al.*, (2017) já relataram a presença de quercetina em polpa e casca de goiaba extraídas por UAE utilizando com metanol ácido 90% por 20 min.

O método ELIAU foi capaz de extrair o maior teor de taninos condensados (6,44 eq. mg g<sup>-1</sup> ac. cafeico) ( $p < 0,05$ ). A extração foi duas vezes superior ao etanol puro e etanol 80% (Tabela 14). Sabe-se que os taninos condensados na forma polimérica (de duas a dez unidades) apresentam baixa solubilidade em água. Por outro lado, a forma oligomérica é solúvel em água (CHAI *et al.*, 2019; DE HOYOS-MARTÍNEZ *et al.*, 2019). Portanto, é possível observar que a soma dos resultados para os extratos obtidos com água e metanol 80% são semelhantes ao ELIAU. Indicando que o LI [BMIM][BF<sub>4</sub>] pode ter acessado ambas as frações (polimérica e oligomérica) de taninos condensados na matriz.

Os resultados da Tabela 14 mostram que o método ELIAU conseguiu recuperar o maior teor de compostos *orto*-difenólicos quando comparado aos VOS avaliados. Não foi verificada diferença estatística entre o LI [BMIM][BF<sub>4</sub>] e o etanol puro para recuperação de ortodifenóis ( $p < 0,05$ ), sugerindo que o método proposto pode ser uma alternativa para substituição deste solvente orgânico.

A atividade antioxidante pelo método de DPPH para o extrato obtido por ELIAU (14,28 mg g<sup>-1</sup> ac ascórbico) foi semelhante à obtida pela extração com etanol 50% e metanol 50% (16,58 e 16,32 mg g<sup>-1</sup> ac ascórbico, respectivamente) ( $p > 0,05$ ) (Tabela 14).

O extrato obtido pelo método ELIAU, utilizando o método de ABTS, apresentou o maior potencial antioxidante ( $p < 0,05$ ) em relação aos VOS utilizados neste estudo. Isso sugere que o processo de otimização e o uso do LI podem efetivamente extrair os compostos fenólicos do resíduo do processamento da goiaba (Tabela 14).

Thaipong *et al.* (2006) relataram uma atividade antioxidante (ABTS) entre 0,19 a 0,29 e 11,47-19,50 eq. mg g<sup>-1</sup> Trolox para extratos obtidos com diclorometano e metanol, respectivamente, em quatro genótipos de goiaba. Contreras-Calderón *et al.* (2011) relataram 23,05 eq. mg g<sup>-1</sup> Trolox usando uma extração sequencial com metanol 50% e acetona 70%. Esses resultados foram inferiores aos resultados relatados para o método ELIAU (43,60 eq. mg g<sup>-1</sup> Trolox (Tabela 14).

Os resultados da atividade antioxidante obtido pelo ensaio FRAP foi de 20,71 eq. mg g<sup>-1</sup> ascórbico ac., que representa um valor de 26% e 33% superior aos extratos obtidos com etanol 50% e metanol 50%, respectivamente (Tabela 14). Lima *et al.* (2019), Nunes *et al.* (2016) e Thaipong *et al.* (2006) relataram resultados de atividade antioxidante por FRAP para goiaba

e seus resíduo. No entanto, em seus trabalhos, utilizaram padrões de quantificação diferentes, dificultando a comparação com os valores obtidos pelo método ELIAU.

A inibição da peroxidação lipídica no sistema biológico para o extrato obtido por ELIAU, etanol 50% e água acidificada não apresentou diferença significativa ( $p>0,05$ ). No entanto, a inibição da peroxidação lipídica para o extrato obtido por ELIAU foi superior em comparação aos extratos obtidos com água, etanol puro, metanol puro e metanol 80%. Esses resultados sugerem que o LI superou alguns solventes tradicionais para a extração de compostos bioativos com potencial antioxidante. Não foi encontrado na literatura estudos relatando a inibição da peroxidação lipídica em gema de ovo para goiaba e seus resíduos.

O potencial quelante de  $Fe^{2+}$  do extrato ELIAU avaliado pela inibição da formação do complexo  $Fe^{2+}$ -ferrozina, foi de 19,12%. Este resultado foi apenas superior em relação a água acidificada. Por outro lado, quando comparado ao metanol puro, não foi observada diferença significativa ( $p>0,05$ ). Os extratos obtidos com metanol 80% (46,13% de inibição) apresentaram o maior potencial de quelação de  $Fe^{2+}$  (Tabela 14). Wu *et al.*, (2009), relataram o potencial de extratos de goiaba com concentrações de 100, 200 e 400  $\mu g mL^{-1}$  com inibições de 41, 65 e 84% de quelar  $Fe^{2+}$ , respectivamente.

Tem sido relatado que os principais compostos fenólicos no resíduo da goiaba são, ácido vanílico, ácido elágico, ácido gálico e quercetina (LIMA *et al.*, 2019). Os compostos fenólicos como o ácido ferúlico, vanílico e siríngico não têm potencial para quelar  $Fe^{2+}$  porque não há grupos catecol ou galoil em sua estrutura. Por outro lado, compostos como ácido gálico, ácido cafeico e ácido clorogênico são capazes de quelar  $Fe^{2+}$  (ANDJELKOVIC *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2017).

O extrato obtido por ELIAU apresentou maior capacidade de inibir a formação do complexo  $Cu^{2+}$ -pirocatecol (68,60%) e foi significativo ( $p<0,05$ ) quando comparado aos VOS (Tabela 14). Sabe-se que a presença de grupos metoxila e hidroxila na posição *orto* de compostos fenólicos aumenta seu potencial para quelar  $Cu^{2+}$  (SANTOS *et al.*, 2017). Esse resultado pode estar associado ao teor de compostos *ortodifenólicos* no extrato ELIAU, o qual foi superior aos extratos obtidos com VOS.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A revisão bibliográfica realizada na etapa 1, indicou que a utilização de LIs como método alternativo para recuperação de compostos bioativos tem se mostrado mais vantajosa, como menor tempo, menor uso de energia e rendimentos superiores de extração em relação aos métodos tradicionais de recuperação de compostos alvo. LI podem ser considerados novos solventes para substituir VOS em procedimentos de extração. No entanto, é um desafio estudar e compreender os LIs, devido aos seus potenciais efeitos toxicológicos na saúde humana, de forma a utilizar suas propriedades para a extração de compostos naturais a serem aplicados em alimentos, no que diz respeito ao estabelecimento de doses residuais seguras para a saúde. Dessa forma, há atualmente uma necessidade de atualização da legislação pelas principais agências reguladoras internacionais de alimentos para incluir novas classes de solventes, como os LI. Portanto, mais pesquisas são necessárias para entender os efeitos dos LIs em células e órgãos humanos para apoiar a aplicação em alimentos e então uma possível atualização das regulamentações que regem o uso de solventes extratores.

A prospecção científica, realizada na etapa 2, indicou que existem muitos estudos com o emprego de LIs, entretanto esse número é inferior quando se trata da aplicação dos mesmos em processos de extração. A prospecção tecnológica, avaliada na mesma etapa, sugeriu um baixo índice de invenções relacionando LIs, também como o baixo índice de proteção e transferência tecnológica dos trabalhos desenvolvidos por universidades e centros de pesquisa.

A metodologia empregada na etapa 3 do trabalho, demonstrou ser eficiente para a recuperação de compostos fenólicos com ação antioxidante das amostras do resíduo do processamento da goiaba. Nessa etapa, as respostas de composição fenólica total e atividade antioxidante obtidas para os extratos indicam que a solução aquosa do LI [BMIM][Cl] 2,5 mol L<sup>-1</sup> é uma alternativa em potencial para a substituição de VOS, em especial o metanol, que é um solvente tradicional nas extrações de compostos bioativos, estudado nessa etapa.

O processo de otimização da metodologia de extração por líquidos iônicos assistida por ultrassom (ELIAU) avaliado, na etapa 4, foi capaz de recuperar os fenólicos totais do resíduo do processamento da goiaba, especialmente aqueles compostos com atividade antioxidante. Resumidamente, as condições de razão amostra/solvente de 20 g L<sup>-1</sup> de resíduo de goiaba, 25 min de extração por ultrassom, a 45 °C, usando 100% de uma solução de 2,5 mol L<sup>-1</sup> de [BMIM][BF<sub>4</sub>] (concentração demonstrada eficaz na etapa 3) recuperaram classes importantes de polifenóis como taninos condensados e *orto*-difenóis, em substituição aos solventes etanol e suas soluções, metanol e suas soluções, água e água acidificada.

Além disso, os extratos ELIAU apresentaram resultados positivos na quantificação da atividade antioxidante. O método foi capaz de extrair uma maior quantidade de compostos com ação antioxidante em relação a solventes tradicionais nas análises de DPPH, ABTS, FRAP e no poder quelante do íon  $\text{Cu}^{2+}$ , indicando que com o processo de otimização o uso de LI como agente extrator é uma possibilidade frente aos tradicionais solventes avaliados.

Desse modo, a valorização de resíduos agroindustriais torna-se uma alternativa para a formulação de alimentos e produtos com apelo bioativo, utilizando matrizes que até então seriam descartadas, prejudicando o meio ambiente. Além do fato da agregação de um valor comercial para certos tipos de rejeitos que apresentam grande potencial bioativo, assim como a casca e sementes de goiaba, que fizeram parte dos resíduos estudados nesse projeto.

Além disso, os LIs podem ser uma opção sustentável em substituição aos VOS, fazendo parte de métodos e processos inovadores de extração de compostos vegetais.

Como sugestão para trabalhos futuros, realizar a análise do perfil individual dos compostos fenólicos do extrato obtido com LI por meio de técnicas de separação cromatográfica. Além disso, realizar a separação do LI por meio de um processo de cristalização a baixa temperatura e/ou separação por resina, avaliar o seu residual e investigar a toxicidade dos extratos por técnica *in vitro* e posteriormente *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

ABUD, Ana Karla de S.; NARAIN, Narenda. Incorporação da farinha de resíduo do processamento de polpa de fruta em biscoitos: uma alternativa de combate ao desperdício. **BRAZILIAN JOURNAL OF FOOD TECHNOLOGY**, [s. l.], v. 12, n. 04, p. 257–265, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4260/BJFT2009800900020>

ACOSTA-ESTRADA, Beatriz A.; GUTIÉRREZ-URIBE, Janet A.; SERNA-SALDÍVAR, Sergio O. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 152, p. 46–55, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.093>

ALMULAIKY, Yaaser *et al.* Assessment of antioxidant and antibacterial properties in two types of Yemeni guava cultivars. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 16, p. 90–97, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.025>

ALSHIKH, Nehal; DE CAMARGO, Adriano Costa; SHAHIDI, Fereidoon. Phenolics of selected lentil cultivars: Antioxidant activities and inhibition of low-density lipoprotein and DNA damage. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 18, p. 1022–1038, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.018>

AMADO ALVIZ, Patricia Lucía; ALVAREZ, Alejandro J. Comparative life cycle assessment of the use of an ionic liquid ([Bmim]Br) versus a volatile organic solvent in the production of acetylsalicylic acid. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 168, p. 1614–1624, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.02.107>

ANDJELKOVIC, M *et al.* Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 98, n. 1, p. 23–31, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.044>

ANVISA. **RDC N° 466**. [S. l.: s. n.], 2021. Disponível em: [http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5918056/%283%29RDC\\_466\\_2021\\_COMP.pdf/d31c2aa0-d071-4e02-99bd-b3a26a2dd11e](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5918056/%283%29RDC_466_2021_COMP.pdf/d31c2aa0-d071-4e02-99bd-b3a26a2dd11e)

ARAGONÈS, Gerard *et al.* The importance of studying cell metabolism when testing the bioactivity of phenolic compounds. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 69, p. 230–242, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.001>

BAĞDA, Esra; TÜZEN, Mustafa. A simple and sensitive vortex-assisted ionic liquid-dispersive microextraction and spectrophotometric determination of selenium in food samples. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 232, p. 98–104, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.104>

BANERJEE, Jhumur *et al.* Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 225, p. 10–22, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.093>

BARIK, Sipra; PAUL, Kakoli Karar. Potential reuse of kitchen food waste. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 196–204, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.11.026>

BARRULAS, Raquel V.; PAIVA, Tiago G.; CORVO, Marta C. NMR methodology for

a rational selection of ionic liquids: extracting polyphenols. **Separation and Purification Technology**, [s. l.], v. 221, p. 29–37, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.03.077>

BATISTA SILVA, Willian *et al.* Chitosan delays ripening and ROS production in guava (*Psidium guajava* L.) fruit. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 242, p. 232–238, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.052>

BELWAL, Tarun *et al.* Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Berberis asiatica* fruits using response surface methodology (RSM). **Food Chemistry**, [s. l.], v. 207, p. 115–124, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.081>

BENVENUTTI, Laís; ZIELINSKI, Acácio Antonio Ferreira; FERREIRA, Sandra Regina Salvador. Which is the best food emerging solvent: IL, DES or NADES? **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 90, p. 133–146, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.003>

BENZIE, Iris F.F.; STRAIN, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>. Acesso em: 10 nov. 2017.

BERTAGNOLLI, Silvana Maria Michelin *et al.* Bioactive compounds and acceptance of cookies made with Guava peel flour. **Food Science and Technology (Campinas)**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 303–308, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/fst.2014.0046>

BERTHOD, A.; RUIZ-ÁNGEL, M.J.; CARDA-BROCH, S. Recent advances on ionic liquid uses in separation techniques. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.044>

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

BRAZILIAN INSTITUTE FOR GEOGRAPHY AND STATISTICS. **Municipal Agricultural Production - PAM**. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?=&t=resultados>. Acesso em: 11 maio 2021.

BUBALO, Marina Cvjetko *et al.* A comparative study of ultrasound-, microwave-, and microreactor-assisted imidazolium-based ionic liquid synthesis. **Green Processing and Synthesis**, [s. l.], v. 2, n. 6, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/gps-2013-0086>

CAMELO, Luiz Carlos Lemos *et al.* INCLUSÃO DE FARELO DE GOIABA NA DIETA DE CODORNAS EUROPEÍAS. **Ciência Animal Brasileira**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 343–349, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1089-6891v16i324342>. Acesso em: 7 fev. 2019.

CAMPOLI, Stephanie Suarez *et al.* Ultrasound processing of guava juice: Effect on structure, physical properties and lycopene in vitro accessibility. **Food Chemistry**, [s. l.], v.

268, p. 594–601, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.127>

CAO, Jun *et al.* Ultrasound-assisted ionic liquid-based micellar extraction combined with microcrystalline cellulose as sorbent in dispersive microextraction for the determination of phenolic compounds in propolis. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 963, p. 24–32, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.063>

CAO, Xiaoji *et al.* Ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction of piperine from white pepper. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 640, n. 1–2, p. 47–51, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.03.029>

CARDA–BROCH, S.; BERTHOD, A.; ARMSTRONG, D. W. Solvent properties of the 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 375, n. 2, p. 191–199, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1684-1>

CARTER, Paul. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 450–458, 1971. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90405-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90405-2)

CASAROTTI, Sabrina N. *et al.* Guava, orange and passion fruit by-products: Characterization and its impacts on kinetics of acidification and properties of probiotic fermented products. **LWT**, [s. l.], v. 98, p. 69–76, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.08.010>. Acesso em: 30 set. 2019.

CHAI, Weiming *et al.* Anti- $\alpha$ -glucosidase and antityrosinase activity of condensed tannins from the bark of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels with antiproliferative and apoptotic properties in B16 mouse melanoma cells. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 86, p. 205–214, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.08.005>

CHANDRASEKARA, Anoma; SHAHIDI, Fereidoon. Herbal beverages: Bioactive compounds and their role in disease risk reduction - A review. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 451–458, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtcm.2017.08.006>

CHEN, Hsiu-Liang *et al.* Cytotoxicity of Imidazole Ionic Liquids in Human Lung Carcinoma A549 Cell Line. **Journal of the Chinese Chemical Society**, [s. l.], v. 61, n. 7, p. 763–769, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jccs.201300632>

CHEN, Mingtao *et al.* Advances in phosphonium-based ionic liquids and poly(ionic liquid)s as conductive materials. **European Polymer Journal**, [s. l.], v. 108, p. 28–37, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.08.015>

CHOI, Young Hae; VERPOORTE, Robert. Green solvents for the extraction of bioactive compounds from natural products using ionic liquids and deep eutectic solvents. **Current Opinion in Food Science**, [s. l.], v. 26, p. 87–93, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.04.003>

CLAUS, Johanna; SOMMER, Fridolin O.; KRAGL, Udo. Ionic liquids in biotechnology and beyond. **Solid State Ionics**, [s. l.], v. 314, p. 119–128, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ssi.2017.11.012>

COMBES, Robert D. The Use of Human Cells in Biomedical Research and Testing. **Alternatives to Laboratory Animals**, [s. l.], v. 32, n. 1\_suppl, p. 43–49, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/026119290403201s08>

COMMISSION, European. **Extraction solvents**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: [https://ec.europa.eu/food/safety/food-improvement-agents/extraction-solvents\\_en](https://ec.europa.eu/food/safety/food-improvement-agents/extraction-solvents_en). Acesso em: 9 ago. 2021.

CONTRERAS-CALDERÓN, José *et al.* Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. **Food Research International**, [s. l.], v. 44, n. 7, p. 2047–2053, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.003>

DA SILVA, Ana Carolina; JORGE, Neuza. Bioactive compounds of the lipid fractions of agro-industrial waste. **Food Research International**, [s. l.], v. 66, p. 493–500, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.025>

DAKER, M *et al.* Antioxidant from maize and maize fermented by *Marasmiellus* sp. as stabiliser of lipid-rich foods. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 107, n. 3, p. 1092–1098, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.027>

DARMASIWI, Sari *et al.* Nutraceutical Compounds Production from Guava Seed Waste Fermentation. **Advanced Science Letters**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 4055–4057, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1166/asl.2018.11540>

DE HOYOS-MARTÍNEZ, Pedro L. *et al.* Tannins extraction: A key point for their valorization and cleaner production. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 206, p. 1138–1155, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.09.243>

DE LAURENTIIS, Valeria; CORRADO, Sara; SALA, Serenella. Quantifying household waste of fresh fruit and vegetables in the EU. **Waste Management**, [s. l.], v. 77, p. 238–251, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.04.001>

DEL'ARCO, Ana Paula Wolf Tasca; SYLOS, Célia Maria de. Effect of industrial processing for obtaining guava paste on the antioxidant compounds of guava (*Psidium guajava* L.) 'Paluma' cv. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s. l.], v. 40, n. 2, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0100-29452018011>

DELAPIERRE, Guillaume; SARRUT, Nicolas; MARCHAND, Gilles. **Method for extracting at least one compound from a liquid phase comprising a functionalized ionic liquid, and microfluidic system for implementing said method**. Concessão: 2011.

DIAS, Maria Inês *et al.* Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 82, p. 9–22, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.016>

DJAS, Małgorzata; HENCZKA, Marek. Reactive extraction of carboxylic acids using organic solvents and supercritical fluids: A review. **Separation and Purification Technology**, [s. l.], v. 201, p. 106–119, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.02.010>

DU, Fu-You *et al.* Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds from medicinal plants. **Talanta**, [s. l.], v. 78, n. 3, p. 1177–1184,

2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.01.040>

DU, Fu-You; XIAO, Xiao-Hua; LI, Gong-Ke. Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of trans-resveratrol from *Rhizma Polygoni Cuspidati*. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1140, n. 1–2, p. 56–62, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.049>

DU, Fu-You; XIAO, Xiao-Hua; LI, Gong-Ke. Ionic liquid aqueous solvent-based microwave-assisted hydrolysis for the extraction and HPLC determination of myricetin and quercetin from *Myrica rubra* leaves. **Biomedical Chromatography**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 472–478, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bmc.1470>

ELSEVIER. **Scopus**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.scopus.com/search/form.uri?display=basic>. Acesso em: 1 abr. 2018.

EUROPEAN COMMISSION. **DIRECTIVE 2009/32/EC**. [S. l.: s. n.], 2009. Disponível em: <http://data.europa.eu/eli/dir/2009/32/2010-09-16>

EUROPEAN PATENT OFFICE. **Espacenet Patent search**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com>. Acesso em: 1 abr. 2018.

FAN, Jie-Ping *et al.* Optimization of ionic liquid based ultrasonic assisted extraction of puerarin from *Radix Puerariae Lobatae* by response surface methodology. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 135, n. 4, p. 2299–2306, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.038>

FAN, Yunchang *et al.* Determination of copper(II) ion in food using an ionic liquids-carbon nanotubes-based ion-selective electrode. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s. l.], v. 62, p. 63–68, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.05.003>

FANG, Dong *et al.* A green and novel procedure for the preparation of ionic liquid. [s. l.], 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2007.09.004>. Acesso em: 24 jul. 2018.

FLORES, Gema *et al.* Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 170, p. 327–335, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.076>

FLORES, Gema *et al.* Phenolic-rich extract from the Costa Rican guava (*Psidium friedrichsthalianum*) pulp with antioxidant and anti-inflammatory activity. Potential for COPD therapy. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 141, n. 2, p. 889–895, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.025>

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **Code of Federal Regulations 21 - Food and Drugs/Part 173 - secondary direct food additives permitted in food for human consumption**. [S. l.], 2021. Disponível em: [https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=8fa3e84a3fbbc0a19709815194049d69&mc=true&node=sp21.3.173.c&rgn=div6#se21.3.173\\_1290](https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=8fa3e84a3fbbc0a19709815194049d69&mc=true&node=sp21.3.173.c&rgn=div6#se21.3.173_1290).

FORT, Diego A. *et al.* Can ionic liquids dissolve wood? Processing and analysis of lignocellulosic materials with 1-n-butyl-3-methylimidazolium chloride. **Green Chem.**, [s. l.],

v. 9, n. 1, p. 63–69, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/B607614A>

FRANZOI, Ana Cristina *et al.* Incorporação de líquidos iônicos e nanopartículas metálicas na construção de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, [s. l.], v. 34, n. 6, p. 1042–1050, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000600022>

GARAGA, Mounesha N.; NAYERI, Moheb; MARTINELLI, Anna. Effect of the alkyl chain length in 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquids on inter-molecular interactions and rotational dynamics. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 210, p. 169–177, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.06.055>

GARCÍA-BETANZOS, Claudia Idalid *et al.* Physicochemical, total phenols and pectin methylesterase changes on quality maintenance on guava fruit ( *Psidium guajava* L.) coated with candeuba wax solid lipid nanoparticles-xanthan gum. **Food Research International**, [s. l.], v. 101, p. 218–227, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.065>

GOTI, Andrea; CARDONA, Francesca. **Hydrogen Peroxide in Green Oxidation Reactions: Recent Catalytic Processes**. [S. l.: s. n.], 2013. ISSN 1098-6596.v. 53 Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8457-7\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8457-7_9)

GOVERNMENT OF CANADA. **List of Permitted Carrier or Extraction Solvents (Lists of Permitted Food Additives)**. [S. l.], 2016. Disponível em: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/food-additives/lists-permitted/15-carrier-extraction-solvents.html>.

GRANATO, Daniel; NUNES, Domingos Sávio. **Análises Químicas, Propriedades Funcionais e Controle da Qualidade de Alimentos e Bebidas: uma abordagem teórico-prática**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2016.

GRUZ, Ana Paula Gil *et al.* Recuperação de compostos bioativos a partir do bagaço de uva. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 1147–1157, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000400026>

HAGERMAN, Ann E. **Vanilin Assay**. [S. l.], 2002. Disponível em: [http://www.users.miamioh.edu/hagermae/Vanillin Assay.pdf](http://www.users.miamioh.edu/hagermae/Vanillin%20Assay.pdf). Acesso em: 26 ago. 2021.

HASSAN, Che *et al.* **Polyphenols Recovery from Tropical Fruits (Pink Guava) Wastes via Ultra-Filtration Membrane Technology Application by Optimum Solvent Selection**. **J. Chem. Chem. Eng.** [S. l.: s. n.], 2016. Disponível em: [http://websisni.bsn.go.id/index.php?/sni\\_main/sni/index\\_simple](http://websisni.bsn.go.id/index.php?/sni_main/sni/index_simple). Acesso em: 7 fev. 2019.

HORSZWALD, Anna; ANDLAUER, Wilfried. Characterisation of bioactive compounds in berry juices by traditional photometric and modern microplate methods. **Journal of Berry Research**, [s. l.], v. 1, p. 189–199, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/BR-2011-020>. Acesso em: 17 set. 2019.

HUDDLESTON, Jonathan G. *et al.* Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation. **Green Chemistry**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 156–164, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/b103275p>

HUDDLESTON, Jonathan G. *et al.* Room temperature ionic liquids as novel media for

“clean” liquid-liquid extraction. **Chemical Communications**, [s. l.], n. 16, p. 1765–1766, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/A803999B>. Acesso em: 3 out. 2018.

HWANG, Jee-hyun *et al.* Investigation of dermal toxicity of ionic liquids in monolayer-cultured skin cells and 3D reconstructed human skin models. **Toxicology in Vitro**, [s. l.], v. 46, p. 194–202, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.09.025>

IDSTEIN, Heinz; SCHREIER, Peter. Volatile constituents from guava (*Psidium guajava*, L.) fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 138–143, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf00061a039>

ISMAIL, Balarabe B. *et al.* LC-MS/QTOF identification of phytochemicals and the effects of solvents on phenolic constituents and antioxidant activity of baobab (*Adansonia digitata*) fruit pulp. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 277, p. 279–288, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.10.056>. Acesso em: 26 set. 2019.

JONES, A. *et al.* Ferric reducing antioxidant potential (FRAP) of antioxidants using reaction flow chromatography. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 967, p. 93–101, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.02.032>

KIST, Benno Bernardo *et al.* **Brazilian Fruit Yearbook**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2018. *E-book*.

KO, Min-Jung *et al.* Subcritical water extraction of flavonol quercetin from onion skin. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 102, n. 4, p. 327–333, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.09.008>

KORIEEM, Khaled M.M.; ARBID, Mahmoud S.; SALEH, Hend N. Antidiarrheal and protein conservative activities of *Psidium guajava* in diarrheal rats. **Journal of Integrative Medicine**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 57–65, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joim.2018.12.001>

KOU, Xingran *et al.* Simultaneous extraction of hydrophobic and hydrophilic bioactive compounds from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Food Chemistry**, [s. l.], v. 257, p. 223–229, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.125>

LARANGEIRA, Paula Martins *et al.* Genotoxicity, mutagenicity and cytotoxicity of carotenoids extracted from ionic liquid in multiples organs of Wistar rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, [s. l.], v. 68, n. 10, p. 571–578, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.etp.2016.09.003>

LI, Jingbo; GUO, Zheng. Identification and quantification of phenolic compounds in rapeseed originated lecithin and antioxidant activity evaluation. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 73, p. 397–405, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.039>. Acesso em: 26 out. 2017.

LI, Zheng; SMITH, Kathryn H.; STEVENS, Geoffrey W. The use of environmentally sustainable bio-derived solvents in solvent extraction applications—A review. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 215–220, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2015.07.021>

LIM, Si Yi *et al.* Potential Functional Byproducts from Guava Purée Processing. **Journal**

of **Food Science**, [s. l.], v. 83, n. 6, p. 1522–1532, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14155>

LIMA, Paulo Galdino de. Microwave in Ionic Liquid Synthesis. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 3, n. 4, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20110036>

LIMA, Renan da Silva *et al.* May the superfruit red guava and its processing waste be a potential ingredient in functional foods? **Food Research International**, [s. l.], v. 115, p. 451–459, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.053>

LIRA, Rosa Cavalcante *et al.* Inclusion of guava wastes in feed for broiler chickens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s. l.], v. 38, n. 12, p. 2401–2407, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982009001200016>

LIU, HongKai *et al.* Effects of elicitation on bioactive compounds and biological activities of sprouts. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 53, p. 136–145, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2018.12.019>. Acesso em: 1 mar. 2019.

LOU, Zaixiang *et al.* Ionic liquids based simultaneous ultrasonic and microwave assisted extraction of phenolic compounds from burdock leaves. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 716, p. 28–33, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.03.012>

LU, Yanbin *et al.* Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of phenolic alkaloids from the medicinal plant *Nelumbo nucifera* Gaertn. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1208, n. 1–2, p. 42–46, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.070>

MA, Chun-hui *et al.* Study on ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction of biphenyl cyclooctene lignans from the fruit of *Schisandra chinensis* Baill. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 689, n. 1, p. 110–116, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.01.012>

MA, Wenyan *et al.* Application of ionic liquids based microwave-assisted extraction of three alkaloids N-nornuciferine, O-nornuciferine, and nuciferine from lotus leaf. **Talanta**, [s. l.], v. 80, n. 3, p. 1292–1297, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.09.027>

MA, Xiaobin *et al.* Concentration control of volatile organic compounds by ionic liquid absorption and desorption. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2018.12.019>

MACHADO, Antonio J.T. *et al.* Antiparasitic effect of the *Psidium guajava* L. (guava) and *Psidium brownianum* MART. EX DC. (araçá-de-veado) extracts. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 119, p. 275–280, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.03.018>

MACIEL, Laércio Galvão; TEIXEIRA, Gerson Lopes; BLOCK, Jane Mara. Dataset on the phytochemicals, antioxidants, and minerals contents of pecan nut cake extracts obtained by ultrasound-assisted extraction coupled to a simplex-centroid design. **Data in Brief**, [s. l.], v. 28, p. 105095, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.105095>

MAESTRO DURÁN, R. *et al.* Biodegradación de los compuestos fenólicos presentes en el alpechín. **Grasas y Aceites**, [s. l.], v. 42, n. 4, p. 271–276, 1991. Disponível em:

<https://doi.org/10.3989/gya.1991.v42.i4.1232>

MAGIERA, Sylwia; SOBIK, Anna. Ionic liquid-based ultrasound-assisted extraction coupled with liquid chromatography to determine isoflavones in soy foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s. l.], v. 57, p. 94–101, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.12.016>

MANTOVANI, José Ricardo *et al.* Uso fertilizante de resíduo da indústria processadora de goiabas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 339–342, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452004000200037>

MARGRAF, Tiago *et al.* Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 80, n. 11, p. C2397–C2403, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13077>

MARGRAF, Tiago *et al.* Effects of geographical origin, variety and farming system on the chemical markers and in vitro antioxidant capacity of Brazilian purple grape juices. **Food Research International**, [s. l.], v. 82, p. 145–155, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.02.003>. Acesso em: 18 set. 2019.

MARTINS, Natália; BARROS, Lillian; FERREIRA, Isabel C.F.R. In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 48, p. 1–12, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.008>

MARTINS, Paula Larangeira Garcia; BRAGA, Anna Rafaela; DE ROSSO, Veridiana Vera. Can ionic liquid solvents be applied in the food industry? **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 66, p. 117–124, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.002>

MARTINS, Paula Larangeira Garcia; DE ROSSO, Veridiana Vera. Thermal and light stabilities and antioxidant activity of carotenoids from tomatoes extracted using an ultrasound-assisted completely solvent-free method. **Food Research International**, [s. l.], v. 82, p. 156–164, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.015>

MARTINS, Paula; ROSSO, Veridiana. CAROTENOIDS ACHIEVING FROM TOMATOES DISCARDED USING IONIC LIQUIDS AS EXTRACTING FOR APPLICATION IN FOOD INDUSTRY. *In:* , 2014. **Anais [...]**. [S. l.: s. n.], 2014. p. 35–38. Disponível em: <https://doi.org/10.14684/shewc.14.2014.35-38>

MCCOOK-RUSSELL, Kayanne P. *et al.* Nutritional and nutraceutical comparison of Jamaican Psidium cattleianum (strawberry guava) and Psidium guajava (common guava) fruits. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 134, n. 2, p. 1069–1073, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.018>

MEGAW, Julianne *et al.* Galleria mellonella as a novel in vivo model for assessment of the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. **Chemosphere**, [s. l.], v. 139, p. 197–201, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.026>

MELO, Priscilla Siqueira *et al.* Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 41, n. 6, p. 1088–1093, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011000600027>

MERCADANTE, Adriana Z.; STECK, Andrea; PFANDER, Hanspeter. Carotenoids from Guava ( *Psidium guajava* L.): Isolation and Structure Elucidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 145–151, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf980405r>

MESQUITA, Leonardo M. de Souza *et al.* Ionic liquid-high performance extractive approach to recover carotenoids from *Bactris gasipaes* fruits. **Green Chemistry**, [s. l.], v. 21, n. 9, p. 2380–2391, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C8GC03283A>

MILANI, Livia P.G. *et al.* Extract from byproduct *Psidium guajava* standardized in ellagic acid: additivation of the in vitro photoprotective efficacy of a cosmetic formulation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 692–696, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.08.005>

MIN, Sea C. *et al.* In-package atmospheric cold plasma treatment of bulk grape tomatoes for microbiological safety and preservation. **Food Research International**, [s. l.], v. 108, p. 378–386, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.033>

MOHANTY, Bimal Prasanna *et al.* Nutritional composition of food fishes and their importance in providing food and nutritional security. **Food Chemistry**, [s. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.039>

MOON, J.N. *et al.* Physicochemical characterization and deodorant activity of essential oil recovered from *Asiasarum heterotropoides* using supercritical carbon dioxide and organic solvents. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, [s. l.], v. 69, p. 217–224, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.09.019>

MOON, Pamela *et al.* Assessment of fruit aroma for twenty-seven guava ( *Psidium guajava* ) accessions through three fruit developmental stages. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 238, p. 375–383, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.067>

MURADOR, Daniella C. *et al.* Ionic liquid associated with ultrasonic-assisted extraction: A new approach to obtain carotenoids from orange peel. **Food Research International**, [s. l.], v. 126, p. 108653, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108653>

MURMU, Sanchita Biswas; MISHRA, Hari Niwas. **Post-harvest shelf-life of banana and guava: Mechanisms of common degradation problems and emerging counteracting strategies**. [S. l.]: Elsevier, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.07.011>. Acesso em: 28 jan. 2019.

NAIR, M. Sneha; SAXENA, Alok; KAUR, Charanjit. Effect of chitosan and alginate based coatings enriched with pomegranate peel extract to extend the postharvest quality of guava (*Psidium guajava* L.). **Food Chemistry**, [s. l.], v. 240, p. 245–252, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.122>

NARENDERAN, S.T.; MEYYANATHAN, S.N.; KARRI, Veera Venkata Satyanarayana Reddy. Experimental design in pesticide extraction methods: A review. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 289, p. 384–395, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.045>

NEMESTÓTHY, Nándor *et al.* Enzyme kinetics approach to assess biocatalyst inhibition and deactivation caused by [bmim][Cl] ionic liquid during cellulose hydrolysis. **Bioresource**

**Technology**, [s. l.], v. 229, p. 190–195, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.004>

NESSIM, M.I.; ZAKY, M.T.; DEYAB, M.A. Three new gemini ionic liquids: Synthesis, characterizations and anticorrosion applications. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 266, p. 703–710, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.07.001>

NETO, Luiz Gonzaga. **PRODUÇÃO DE GOIABA**. 1. ed. Fortaleza: [s. n.], 2007. *E-book*.

NINGA, Kombele Aimé *et al.* Kinetics of enzymatic hydrolysis of pectinaceous matter in guava juice. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 221, p. 158–166, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.10.022>

NIÑO-MEDINA, G. *et al.* **Structure and content of phenolics in eggplant (Solanum melongena) - a review**. [S. l.]: Elsevier, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.03.016>. Acesso em: 25 out. 2017.

NUNES, Juliana C. *et al.* Effect of drying method on volatile compounds, phenolic profile and antioxidant capacity of guava powders. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 197, p. 881–890, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.050>

OJEWOLE, J.A.O. Anti-Inflammatory and analgesic effects of Psidium guajava Linn. (myrtaceae) leaf aqueous extracts in rats and mice. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, [s. l.], v. 28, n. 7, p. 441, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1358/mf.2006.28.7.1003578>

POOLE, Colin F.; POOLE, Salwa K. Extraction of organic compounds with room temperature ionic liquids. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1217, n. 16, p. 2268–2286, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.011>

PRICE, Martin L.; BUTLER, Larry G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 1268–1273, 1977. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf60214a034>

RAKMAI, Jaruporn *et al.* Antioxidant and antimicrobial properties of encapsulated guava leaf oil in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 111, p. 219–225, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.027>

RAMOS-VARGAS, Sarai *et al.* Removal of Fluoride and Arsenate from Aqueous Solutions by Aluminum-Modified Guava Seeds. **Applied Sciences**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 1807, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app8101807>

RECHARLA, Neeraja *et al.* Novel technologies to enhance solubility of food-derived bioactive compounds: A review. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 39, p. 63–73, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.10.001>

REZAEI, Atefe; FATHI, Milad; JAFARI, Seid Mahdi. Nanoencapsulation of hydrophobic and low-soluble food bioactive compounds within different nanocarriers. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 88, p. 146–162, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2018.10.003>. Acesso em: 1 mar. 2019.

RODRIGUEZ-AMAYA, Délia B.; KIMURA, Mieko; FARFAN-AMAYA, Jaime. **Tabela Brasileira de Composição de Carotenóides em Alimentos**. [S. l.: s. n.], 2008. v. 52

ROJAS-GARBANZO, Carolina *et al.* Characterization of phenolic and other polar compounds in peel and flesh of pink guava (*Psidium guajava* L. cv. 'Criolla') by ultra-high performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. **Food Research International**, [s. l.], v. 100, p. 445–453, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.004>. Acesso em: 11 nov. 2019.

ROSSO, Veridiana Vera de; MARTINS, Paula Laranjeira Garcia. **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CAROTENOIDES DE TOMATES PROVENIENTES DE DESCARTE E USO DE CAROTENOIDES OBTIDOS**. Concessão: 2017.

ROSTAMABADI, Hadis; FALSAFI, Seid Reza; JAFARI, Seid Mahdi. Nanoencapsulation of carotenoids within lipid-based nanocarriers. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 298, p. 38–67, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.02.005>

RUFINO, Maria do Socorro Moura *et al.* Comunicado Técnico da Embrapa 127 - Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado Técnico Embrapa 127**, [s. l.], p. 1–4, 2007. Disponível em: [https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10225/1/Cot\\_128.pdf](https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10225/1/Cot_128.pdf). Acesso em: 18 set. 2019.

RYKOWSKA, I.; ZIEMBLIŃSKA, J.; NOWAK, I. Modern approaches in dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) based on ionic liquids: A review. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 259, p. 319–339, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.03.043>

SABA, Hina *et al.* Determination of physical properties for the mixtures of [BMIM]Cl with different organic solvents. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 804–811, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2014.06.039>

SAIGA, Ai; TANABE, Soichi; NISHIMURA, Toshihide. Antioxidant Activity of Peptides Obtained from Porcine Myofibrillar Proteins by Protease Treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 51, n. 12, p. 3661–3667, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf021156g>

SANDA, K.A. *et al.* Pharmacological Aspects of *Psidium guajava*: An Update. **International Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 316–324, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3923/ijp.2011.316.324>

SANTOS, Cíntia M. dos *et al.* Red Propolis as a Source of Antimicrobial Phytochemicals: Extraction Using High-Performance Alternative Solvents. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.659911>

SANTOS, Walter Nei Lopes dos *et al.* Simultaneous determination of 13 phenolic bioactive compounds in guava (*Psidium guajava* L.) by HPLC-PAD with evaluation using PCA and Neural Network Analysis (NNA). **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 133, p. 583–592, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.04.029>. Acesso em: 2 out. 2017.

SANTOS, Jânio Sousa; BRIZOLA, Vitor Rafael Alvarenga; GRANATO, Daniel. High-

throughput assay comparison and standardization for metal chelating capacity screening: A proposal and application. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 214, p. 515–522, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.091>

SCHREKKER, Henri S *et al.* Preparation, Cation-Anion Interactions and Physicochemical Properties of Ether-Functionalized Imidazolium Ionic Liquids. **J. Braz. Chem. Soc.**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 426–433, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jbchs/v19n3/a09v19n3.pdf>. Acesso em: 24 jul. 2018.

SCHULZ, Mayara *et al.* Blackberry (*Rubus ulmifolius* Schott): Chemical composition, phenolic compounds and antioxidant capacity in two edible stages. **Food Research International**, [s. l.], 2019a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.034>

SCHULZ, Mayara *et al.* Neuroprotective effect of juçara (*Euterpe edulis* Martius) fruits extracts against glutamate-induced oxytosis in HT22 hippocampal cells. **Food Research International**, [s. l.], v. 120, p. 114–123, 2019b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.030>

SCOPUS. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: [https://www.scopus.com/results/results.uri?src=s&sot=b&sdt=b&origin=searchbasic&rr=&sl=28&s=TITLE-ABS-KEY\(Ionic Liquids\)&searchterm1=Ionic Liquids&searchTerms=&connectors=&field1=TITLE\\_ABS\\_KEY&fields=](https://www.scopus.com/results/results.uri?src=s&sot=b&sdt=b&origin=searchbasic&rr=&sl=28&s=TITLE-ABS-KEY(Ionic Liquids)&searchterm1=Ionic Liquids&searchTerms=&connectors=&field1=TITLE_ABS_KEY&fields=). Acesso em: 24 maio 2021.

SEBEN JUNIOR, Getulio de Freitas *et al.* Agregação de um argissolo sob pomar de goiabeiras após aplicação de resíduos da indústria processadora de goiaba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 1275–1282, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011000400028>

SHAHIDI, Fereidoon; AMBIGAIPALAN, Priyatharini. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 18, p. 820–897, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>. Acesso em: 26 out. 2017.

SHAHIDI, Fereidoon; ZHONG, Ying. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 18, p. 757–781, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>

SHAMSHINA, Julia L *et al.* Chemistry: Develop ionic liquid drugs. **Nature**, [s. l.], v. 528, n. 7581, p. 188–189, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/528188a>

SHELDON, Roger. Catalytic reactions in ionic liquids Historical development. [s. l.], 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/b107270f>. Acesso em: 19 set. 2019.

SHELDON, Roger A. The greening of solvents: Towards sustainable organic synthesis. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, [s. l.], v. 18, p. 13–19, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.11.006>

SILVA, Camila; GARCIA, Vitor Augusto dos Santos; FRANCISCATO, Lidiane Mariah Silva do Santos. Extração Assistida por Ultrassom de Compostos Bioativos das Cascas de Lichia (*Litchi Chinensis* Sonn.). **Revista Ciências Exatas e Naturais**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 81–96, 2016. Disponível em:

<https://pdfs.semanticscholar.org/6e96/75267b44bcfce2207214a8df241cfaa8dedd.pdf>. Acesso em: 23 jul. 2020.

SILVA, Roger Wellington Vicente da *et al.* Uso da metodologia de superfície de resposta na otimização da extração de compostos fenólicos da casca dos frutos de *Hymenaea courbaril* L. (Jatobá). **Brazilian Journal of Food Technology**, [s. l.], v. 22, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.08918>

SINGH, Balwinder *et al.* Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. **Food Research International**, [s. l.], v. 101, p. 1–16, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.026>

SOUSA-AGUIAR, Eduardo F. *et al.* GREEN CHEMISTRY: THE EVOLUTION OF A CONCEPT. **Química Nova**, [s. l.], 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140212>

SOUSA, Mariana Séfora Bezerra; VIEIRA, Luanne Moraes; LIMA, Alessandro de. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s. l.], v. 14, n. 03, p. 202–210, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.4260/BJFT2011140300024>

SOUZA, Henrique Antunes de; NATALE, William; ROZANE, Danilo Eduardo. Avaliação agrônômica da aplicação do resíduo da indústria processadora de goiabas em pomar comercial de goiabeiras. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 969–979, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832011000300031>

SOUZA, Tércio Silva *et al.* Chemotype diversity of *Psidium guajava* L. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 153, p. 129–137, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.06.006>

SPILLER, Samira Haddad *et al.* Modifications in the methods to extract pectin from cv. “Pedro Sato” guavas during ripening. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s. l.], v. 21, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.03217>

SPRONSEN, Jacob Van *et al.* **Process for extracting materials from biological material**. Concessão: 2014.

STONE, Benjamin C. **The flora of Guam : a manual for the identification of the vascular plants of the island**. Micronesia: University of Guam, 1970.

SUN, Jian-Nan; CHEN, Juan; SHI, Yan-Ping. Multiple functional ionic liquids based dispersive liquid–liquid microextraction combined with high performance chromatography for the determination of phenolic compounds in water samples. **Talanta**, [s. l.], v. 125, p. 329–335, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.03.013>

SWATLOSKI, Richard P. *et al.* Dissolution of Cellose with Ionic Liquids. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 124, n. 18, p. 4974–4975, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja025790m>

THAIPONG, Kriengsak *et al.* Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s. l.], v. 19, n. 6–7, p. 669–675, 2006. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2006.01.003>. Acesso em: 25 nov. 2019.

THAMKE, Viresh R.; KODAM, Kisan M. Toxicity study of ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium bromide on guppy fish, *Poecilia reticulata* and its biodegradation by soil bacterium *Rhodococcus hoagii* VRT1. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 320, p. 408–416, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.08.056>

TOBISZEWSKI, Marek; NAMIEŚNIK, Jacek. Greener organic solvents in analytical chemistry. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, [s. l.], v. 5, p. 1–4, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2017.03.002>

TONG, Ruipeng *et al.* Emission characteristics and probabilistic health risk of volatile organic compounds from solvents in wooden furniture manufacturing. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 208, p. 1096–1108, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.195>

TORRES, Sebastian; PANDEY, Ashok; CASTRO, Guillermo R. Organic solvent adaptation of Gram positive bacteria: Applications and biotechnological potentials. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 442–452, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.002>

TÜNEY, İnci *et al.* Antimicrobial Activities of the Extracts of Marine Algae from the Coast of Urla (Zmir, Turkey). **Turkish Journal of Biology**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 171–175, 2006. Disponível em: [file:///C:/Users/Bruno Ferreira/Desktop/Antimicrobial Activities of the Extracts of Marine Algae from the Coast of Urla \(Zmir, Turkey\)\[%23139992\]-121417.pdf](file:///C:/Users/Bruno%20Ferreira/Desktop/Antimicrobial%20Activities%20of%20the%20Extracts%20of%20Marine%20Algae%20from%20the%20Coast%20of%20Urla%20(%20Zmir,%20Turkey)[%23139992]-121417.pdf). Acesso em: 27 fev. 2019.

TUZEN, Mustafa *et al.* A simple, rapid and green ultrasound assisted and ionic liquid dispersive microextraction procedure for the determination of tin in foods employing ETAAS. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 245, p. 380–384, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.115>

UNICAMP. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos TACO**. 4. ed. Campinas: [s. n.], 2011. *E-book*.

VALENTE, Ligia M.M. *et al.* Antiradical activity, nutritional potential and flavonoids of the cladodes of *Opuntia monacantha* (Cactaceae). **Food Chemistry**, [s. l.], v. 123, n. 4, p. 1127–1131, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.074>

VENTURA, Sónia P. M. *et al.* Ionic-Liquid-Mediated Extraction and Separation Processes for Bioactive Compounds: Past, Present, and Future Trends. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 117, n. 10, p. 6984–7052, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00550>

VO DINH, Tri *et al.* Ionic liquid-assisted subcritical water enhances the extraction of phenolics from brown seaweed and its antioxidant activity. **Separation and Purification Technology**, [s. l.], v. 196, p. 287–299, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.06.009>

WASSERSCHIED, Peter; KEIM, Wilhelm. Ionic Liquids—New “Solutions” for Transition Metal Catalysis. **Angewandte Chemie**, [s. l.], v. 39, n. 21, p. 3772–3789, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20001103\)39:21<3772::AID-](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20001103)39:21<3772::AID-)

ANIE3772>3.0.CO;2-5

WEI, Wei *et al.* Characteristics of volatile organic compounds (VOCs) emitted from a petroleum refinery in Beijing, China. **Atmospheric Environment**, [s. l.], v. 89, p. 358–366, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2014.01.038>

WU, Ju-Wen *et al.* Inhibitory effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts and its active compounds on the glycation process of protein. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 113, n. 1, p. 78–84, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.025>

YERMAKOV, A. I.; ARASIMOV, V. V.; YAROSH, N. P. Methods of Biochemical Analysis of Plants. **Leningrad: Agropromizdat**, [s. l.], p. 122–142, 1987.

ZHANG, Cheng *et al.* The acute toxic effects of imidazolium-based ionic liquids with different alkyl-chain lengths and anions on zebrafish ( *Danio rerio* ). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 140, p. 235–240, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.054>

ZHANG, Suojiang *et al.* Physical Properties of Ionic Liquids: Database and Evaluation. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 1475–1517, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.2204959>

ZIYATDINOVA, Guzel; SNEGUREVA, Yulia; BUDNIKOV, Herman. Novel approach for the voltammetric evaluation of antioxidant activity using DPPH[rad]-modified electrode. **Electrochimica Acta**, [s. l.], v. 247, p. 97–106, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.06.155>

ZUORRO, Antonio; MAFFEI, Gianluca; LAVECCHIA, Roberto. Reuse potential of artichoke (*Cynara scolimus* L.) waste for the recovery of phenolic compounds and bioenergy. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 111, p. 279–284, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.06.011>

## ANEXO A – Primeira página do artigo referente a etapa 1 publicado na revista *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.

CRITICAL REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND NUTRITION  
<https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2067115>



REVIEW



### Uses of ionic liquids to obtain bioactive compounds: insights from the main international regulations for technological applications

Bruno L. Ferreira<sup>a</sup> , Daniel Granato<sup>b</sup> and Itaciara L. Nunes<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil; <sup>b</sup>Department of Biological Sciences, Faculty of Science and Engineering, University of Limerick, Limerick, Ireland

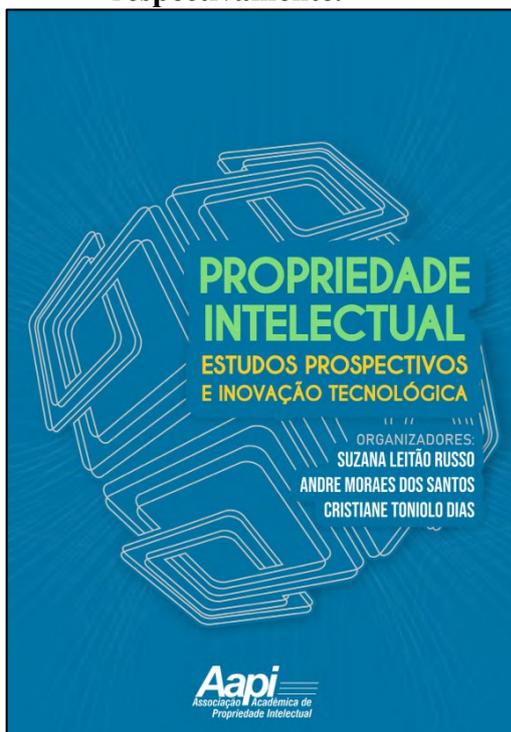
#### ABSTRACT

Ionic liquids (IL) are innovative alternative solvents to recover bioactive compounds from plant-based sources to replace toxic volatile organic solvents (VOS). ILs are tailored-made solvents with chemical and thermal stabilities, nonvolatile and nonflammable. Although ILs are versatile, cost-effective, and sustainable solutions, the European Commission (EC) has no current regulation to approve extracts obtained with ILs to be applied in foods. Herein, this paper aims to assess the overview of ILs, regulation, applications, and its toxic effects, to be used as solvents for extract different bioactive compounds. Studies have suggested novel applications for ILs, such as 1-butyl-3-methylimidazolium bromide, 1-butyl-3-methylimidazolium chloride, 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate and others, to obtain bioactive compounds, for instance phenolic compounds, lignans, alkaloids, carotenoids, polysaccharides, using modern approaches as ultrasound and microwave-assisted extraction. New IL methods increase the efficiency of recovering target compounds and decrease the extraction time and VOS consumption regarding the traditional techniques. Furthermore, to promote the large-scale use of IL in foods, it is essential to investigate individually the toxicity of each IL used in the extraction processes, aiming to obtain a GRAS stamp, due to the currently lack of regulation.

#### KEYWORDS

Innovative solvents;  
extraction methods;  
ultrasound-assisted extraction;  
toxicity of ionic liquids;  
volatile organic solvents;  
EU regulations

**ANEXO B - Primeira página do livro e do capítulo do livro publicado na etapa 2, respectivamente.**



**PANORAMA SOBRE O EMPREGO DE LÍQUIDOS IÔNICOS: PROSPECÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA**

Bruno Luis Ferreira  
Itaciara Larroza Nunes

**1 INTRODUÇÃO**

**S**olvente orgânicos amplamente utilizados em laboratórios apresentam uma alta pressão de vapor, ou seja, uma grande tendência natural para a volatilização, ocasionando contaminações ambientais e para a saúde humana. Nesse sentido, novos solventes têm sido considerados como alternativa aos tradicionais (CLAUS; SOMMER; KRAGL, 2018; MAGIERA; SOBIK, 2017).

Os líquidos iônicos (LI) são substâncias com ponto de fusão abaixo de 100 °C, variável viscosidade, estabilidade química e térmica, não inflamáveis, alta condutividade e baixa pressão de vapor. São atualmente considerados como solventes promissores em substituição aos tradicionais solventes orgânicos, principalmente por sua aplicação tecnológica e seu potencial ambientalmente menos agressivo (MAGIERA; SOBIK, 2017; MARTINS; BRAGA; DE ROSSO, 2017; TUZEN et al., 2018).

Por sua grande versatilidade, a utilização de líquidos iônicos como ferramenta tem sido amplamente empregada para diversas finalidades, incluindo sínteses orgânicas, na engenharia química, assim como na área da ciência de alimentos para a extração de metais (FAN et al., 2017; TUZEN et al., 2018), e extração de compostos fenólicos os quais exercem atividade antioxidante (CAO et al., 2017; VO DINH et al., 2018).

Dentre os compostos que apresentam ação antioxidante, podemos citar o licopeno, que é caracterizado por ser um composto de caráter lipofílico da família dos carotenoides. O consumo de alimentos que contém licopeno está associado a prevenção de doenças cardiovasculares e também alguns tipos de câncer. As maiores concentrações podem ser encontradas principalmente no tomate, porém outros alimentos também o apresentam em sua composição, assim como goiaba, mamão e melancia (COSTA-RODRIGUES; PINHO; MONTEIRO, 2018; SOUZA et al., 2018).

**ANEXO C - Primeira página do artigo referente a etapa 4 publicado na revista  
*Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.**



Biocatalysis and Agricultural Biotechnology  
Available online 27 October 2021, 102196  
In Press, Journal Pre-proof



Recommended articles 

No articles found.

---

Citing articles (0)

---

## Innovative approach for obtaining phenolic compounds from guava (*Psidium guajava* L.) coproduct using ionic liquid ultrasound-assisted extraction (IL-UAE)

Bruno Luís Ferreira <sup>a</sup>, Tufy Kabbas Junior <sup>b</sup>, Jane Mara Block <sup>a</sup>, Daniel Granato <sup>c</sup>, Itaciara Larroza Nunes <sup>a</sup> 

[Show more](#) 

[+](#) Add to Mendeley [↻](#) Share [📄](#) Cite

---

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102196> [Get rights and content](#)