UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Vinícius Feldstein Haddad

Preparação, caracterização e aplicação de solvente eutético profundo natural composto por mentol e ácido caprílico na extração de compostos bioativos de resíduos da indústria alimentícia

Florianópolis
2023

Vinícius Feldstein Haddad

Preparação, caracterização e aplicação de solvente eutético profundo natural composto por mentol e ácido caprílico na extração de compostos bioativos de resíduos da indústria alimentícia

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Química Analítica
Orientador: Prof. Dr Luciano Vitali.

Florianópolis
2023

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

Haddad, Vinicius Feldstein
Preparação, caracterização e aplicação de solvente eutético profundo natural composto por mentol e ácido caprílico na extração de compostos bioativos de resíduos da indústria alimentícia / Vinícius Feldstein Haddad ; orientador, Luciano Vitali, 2023.
63 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Química. 2. Solvente eutético profundo . 3. Compostos bioativos. I. Vitali, Luciano . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Vinícius Feldstein Haddad

Preparação, caracterização e aplicação de solvente eutético profundo natural composto por mentol e ácido caprílico na extração de compostos bioativos de resíduos da indústria alimentícia

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

Prof. Dr. Luciano Vitali
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Renata Dias de Mello Castanho Amboni
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Cristiane Luisa Jost
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Mestre em Química Analítica.

Documento assinado digitalmente
Giovanni Finoto Caramori
Data: 27/04/2023 10:30:06-0300
CPF: ***.927.338-**
Verifique as assinaturas em https://v.ufsc.br

Prof. Dr, Giovanni Finoto Caramori
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Documento assinado digitalmente
Luciano Vitali
Data: 26/04/2023 17:09:23-0300
CPF: ***.529.060-**
Verifique as assinaturas em https://v.ufsc.br

Prof. Dr. Luciano Vitali
Orientador

[Florianópolis], [2023].

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais Maria Ângela e Celso e meu irmão Matheus Haddad.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Universidade Federal de Santa Catarina, em especial ao Departamento de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Química, pela oportunidade da realização do trabalho.

Ao meu professor orientador Dr. Luciano Vitali, pelos ensinamentos, sejam eles sobre química ou sobre a vida, paciência, atenção, dedicação, e principalmente pela oportunidade de me receber para realizar meu TCC e o mestrado.

Agradecer minha família, em especial meus pais, Maria Ângela e Celso, por me ajudarem em diversos momentos da faculdade e por me apoiarem nas minhas decisões. Estar longe da família não é fácil, então quando se tem o apoio certo, ele deve ser pra sempre lembrado.

Agradecer além dos meus pais, meu irmão Matheus Haddad, que por mais que me tire mais do sério do que me ajude, ele nunca se negou a ajudar.

A toda a minha família do Labecc, que trouxeram diversos ensinamentos e experiencias, mas que trouxeram principalmente amizades que não devem ser deixadas de lado. Cada um de vocês teve uma participação especial na minha jornada, e são momentos que ficarão pra sempre na minha lembrança.

Agradecer também a atlética da química, que foi minha segunda família aqui em Florianópolis e me trouxe diversas experiencias que com certeza serão usadas para vários momentos, seja eles com o trabalho ou atividades extras.

Gostaria de agradecer ao grupo “é os guris” que por mais que não estejam presentes comigo, sempre me trouxeram boas risadas, e me ajudaram em diversos momentos com conselhos que eu vou levar para sempre.

Aos meus amigos que trouxe de Campinas, é difícil agradecer em palavras o tanto que vocês me ajudaram na minha trajetória, somente convivendo com vocês já trouxe uma confiança que no final tudo daria certo.

Amigos são a família que você escolhe, e eu fico feliz que nossos caminhos se cruzaram independente da maneira, e por mais que pra um os amigos verdadeiros são os outros, todos são parte do meu coração.

“Todo mundo é um gênio. Mas, se você julgar um peixe por sua capacidade de subir em uma árvore, ela vai gastar toda a sua vida acreditando que ele é estúpido”.

(Albert Einstein)

RESUMO

A procura de alternativas verdes para substituir os solventes orgânicos tóxicos vem sendo bastante estudada, sendo que uma das mais recente é a utilização de solventes eutéticos profundos (DES). Os DES têm sua síntese simples e são formados por compostos menos perigosos e mais baratos quando comparados com os solventes convencionais. É possível a utilização de ácidos orgânicos e aminoácidos para a síntese do DES, nesse caso são chamados de solventes eutéticos profundos naturais (NADES). Neste estudo, foi sintetizado o NADES formado por mentol e ácido caprílico. O NADES preparado foi caracterizado por diferentes técnicas e aplicado como solvente na extração de compostos bioativos de resíduos da indústria alimentícia. As técnicas de caracterização de RMN-H, DSC, TGA, IV, densidade, viscosidade, índice de refração e ensaio microbiológico, indicaram que o NADES proposto foi obtido com sucesso. A aplicação do NADES foi realizada empregando extração sólido-líquido para extrair compostos fenólicos de casca de maçã e β-caroteno de casca de beterraba e cenoura. Os parâmetros tempo de extração, proporção entre a massa do extrato e volume de NADES e temperatura foram otimizados utilizando planejamentos multivariados e univariados. A condição experimental otimizada para a extração dos fenólicos foi de 105 min para o tempo, 1:2 (m/v) para a proporção e 25 °C para a temperatura. Essas mesmas condições foram também foram aplicadas para a extração do β-caroteno. A análise de compostos fenólicos extraídos da casca de maçã empregando LC-MS/MS revelou a presença de ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido metoxifenilacético, vanilina e ácido 4-aminobenzoico em concentrações variando de 0,99 a 6,45 $\mu g\ g^{-1}$ nos extratos. Enquanto isso, a determinação de β-caroteno nos extratos empregando LC-DAD mostrou uma concentração de 0,44 $\mu g\ g^{-1}$ para casca de beterraba e 790 $\mu g\ g^{-1}$ para casca de casca de cenoura. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram abaixo de 0,5 $mg\ L^{-1}$ permitindo quantificar os compostos bioativos nas diferentes matrizes. O estudo realizado indicou que o NADES avaliado pode ser uma interessante alternativa de solvente verde para a produção de extratos de compostos bioativos a partir de resíduos gerados pela indústria alimentícia. Esses extratos contendo compostos bioativos poderiam ser aplicados na própria indústria alimentícia ou na indústria de cosméticos aja vista os inúmeros benefícios desses compostos bioativos para a saúde, gerando valor agregado aos resíduos avaliados.

Palavras-chave: Solvente eutético profundo natural. Compostos bioativos. Extração sólido-líquido. Resíduos da indústria alimentícia.

ABSTRACT

New green alternatives to replace toxic organic solvents have been extensively studied, and one of the most recent is the use of deep eutectic solvents (DES). They have a simple synthesis and are made with cheaper and less dangerous compounds when compared to conventional solvents. It's possible to use organic acids and amino acids to synthesize DES, in that case they are called natural deep eutectic solvents (NADES). In this study, a NADES was synthesize using menthol and caprylic acid. Different techniques were used to characterize the NADES, and it was applied as a solvent in the extraction of bioactive compounds from food industry residues. The characterization techniques RMN'H, DSC, TGA, IV, density, viscosity, refractive index, and microbiology study indicated that the NADES proposed was successfully obtained. NADES in a solid-liquid extraction of phenolics compounds in apple peel and β-carotene in beetroot and carrot peel. The time of extraction, ratio between the mass of the extracted and volume of NADES and temperature parameters, were optimized using multivariate and univariate designs. The final conditions for the extraction of the phenolics were, 105 minutes for time, 1:2 (m/v) for proportion and 25 °C for temperature. These conditions were also used for the extraction of β-carotene. The analysis of the extracted phenolics compounds in the apple peel using LC-MS/MS showed the presence of chlorogenic acid, ferulic acid, vanillin, metoxifenilacetic acid and 4-aminobenzoic acid in concentrations ranging from 0.99 to 6.45 $\mu g\ g^{-1}$ in the extracts. While, in the determination of β-carotene using LC-DAD showed a concentration of 0.44 $\mu g\ g^{-1}$ for the beetroot peel and 790 $\mu g\ g^{-1}$ for the carrot peel. The limits of detection and quantification obtained were below 0.5 mg L^{-1} allowing to quantification the bioactive compounds in different matrices. The study carried out indicated that the evaluated NADES can be an interesting green solvent alternative for the production of extracts of bioactive compounds from waste generated by the food industry. These extracts containing bioactive compounds could be applied in the food industry itself or in the cosmetics industry, given the numerous benefits of these bioactive compounds for health, generating added value to the evaluated residues.

Keywords: Natural deep eutectic solvent. Bioactive compounds. Solid-liquid extraction. Food industry residues.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de fases de uma mistura eutética indicando os limites entre as fases sólidas e líquida, sendo o ponto eutético indicado por "e". 17

Figura 2. Estrutura molecular do A – ácido caprílico B - Mentol. 20

Figura 3. Diagrama indicando os principais usos de compostos fenólicos para o tratamento de diferentes doenças. 24

Figura 4. Valores de produção bruta para a maçã, cenoura e tomate em 3 regiões do mundo. (Índice utilizado 2014-16 = 100). 26

Figura 5. Representação estrutural do NADES preparado usando ácido caprílico e mentol. .....**Error! Bookmark not defined.**

Figura 6. Espectros de IV para o NADES, mentol e ácido caprílico. 36

Figura 7. Análise de RMN'H para o solvente eutético (mentol:ácido caprílico), para o mentol e para o ácido caprílico. 37

Figura 8. Diagrama de DSC para a análise do DES (mentol:ácido caprílico). 38

Figura 9. TGA para o NADES preparado a partir de ácido caprílico e mentol. 39

Figura 10. Gráfico de pareto obtido através da área cromatográfica para o Ácido 4-aminobenzóico..... 42

Figura 11. Análise univariada do tempo de extração realizada para os cinco compostos fenólicos no extrato de resíduo da indústria de suco de maçã. 43

Figura 12. Cromatogramas extraídos dos cinco compostos fenólicos (ácido 4-aminobenzoico, vanilina, ácido clorogênico, ácido ferúlico e o ácido metoxifenilacético) em extrato de resíduo de indústria de suco de maçã em NADES (A), cromatograma do β-caroteno em extrato de cenoura em NADES (B) e cromatograma do β-caroteno em extrato de beterraba em NADES (C). 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Síntese e caracterização de diferentes DES/NADES. 19

Tabela 2. Exemplos de compostos pertencentes a cada classe de bioativos e valores de Log p e pKa. 22

Tabela 2. *Continuação.* 23

Tabela 4. Exemplos de técnicas de preparo de amostra utilizando DES/NADES como solvente extrator para extração de compostos bioativos..... 27

Tabela 5. Gradiente de eluição utilizado para análise dos compostos fenólicos. 30

Tabela 6. Gradiente de eluição utilizado para análise dos compostos carotenoides. 31

Tabela 7. Parâmetros utilizados no planejamento de experimentos..... 34

Tabela 8. Valores de densidade, viscosidade e índice de refração obtidos para o NADES formado por de ácido caprílico e mentol. 39

Tabela 9. Influência do NADES na inibição das bactérias. 41

Tabela 10. Parâmetros de mérito para as curvas analíticas dos bioativos..... 45

Tabela 11. Valores obtidos para os limites de detecção e quantificação para os diferentes analitos..... 46

Tabela 12. Concentrações calculadas através do método de adição de padrão para os extratos de cenoura, beterra e maçã. 48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA- Análise de variância

ChCl- Cloreto de colina

DES- Solvente eutético profundo (do inglês *deep eutectic solvent*)

DLLME- Microextração dispersiva líquido-líquido (do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction*)

DSC- Calorimetria exploratória diferencial (do inglês *differencial scanning calorimetry*)

FAO- Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*)

FAOSTAT- estatísticas da FAO

HBA- aceptor de ligação de hidrogênio (do inglês *hydrogen bond acceptor*)

HBD- doador de ligação de hidrogênio (do inglês *hydrogen bond donor*)

HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *high performance liquid cromatographic*)

IV- Infravermelho

LD- Limite de detecção

LPME- Microextração de fase sólida (do inglês *liquid phase microextraciton*)

LQ- Limite de quantificação

M-D-μSPE- Extração de fase sólida miniaturizada (do inglês *miniaturized solid-phase extraction*)

NADES- Solvente eutético profundo natural (do inglês *natural deep euctic solvent*)

R^2- Coeficiente de determinação

RMN-H- Ressonância magnética de hidrogênio

SPE- Extração de fase sólida (do inglês *solid phase extraction*)

TGA- Termogravimetria (do inglês thermogravimetric analysis)

UNEP- Programa das Nações Unidas para o meio ambiente (do inglês *UN environment programme*)

ZI – Zona de inibição

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 REVISÃO DA LITERATURA 17
2.1 Solventes eutéticos profundos 17
2.1.1 Propriedades físico-químicas dos DES 18
2.1.2 Solventes eutéticos profundos naturais 20
2.2 Compostos biativos 21
2.2.1 Carotenoides 23
2.2.2 Compostos fenólicos 24
2.3 Resíduos da indústria alimentícia e uso de des na determinação de compostos bioativos 25
3 OBJETIVOS 28
4 MATERIAIS E MÉTODOS 28
4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES 28
4.2 INSTRUMENTAÇÃO E MÉTODOS UTILIZADOS 29
4.2.1 Instrumentação 29
4.2.2 Análise dos compostos fenólicos por LC-MS/MS 30
4.2.3 Análise dos compostos carotenoides por LC-DAD 31
4.4 CARACTERIZAÇÃO DO DES 32
4.4.1 DSC E TGA 32
4.4.2 Ensaio microbiológico do DES 33
4.4.3 Viscosidade, densidade e índice de refração 33
4.4.4 Infravermelho e RMN'H 33
4.5 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO. 33
4.6 Parâmetros analíticos de mérito e determinação das concentrações dos compostos bioativos na amostras de extratos 34
4.7 Amostra de resíduo da indústria alimentícia .....**Error! Bookmark not defined.**
4.7.1 Resíduo industrial do suco da maçã 32
4.7.2 Resíduo de casca de legumes 32

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 35
5.1 Preparo do DES 35
5.2 Caracterização do nades 35
5.2.1 Infravermelho 35
5.2.2 RMN'H 36
5.2.3 Calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria 37
5.2.4 Densidade, viscosidade e índice de refração 39
5.2.5 Ensaio microbiológico 40
5.3 Otimização dos parâmetros de extração sólido-líquido dos compostos de interesse com o DES a partir dos resíduos da indústria alimentícia. 41
5.4 Avaliação dos parâmetros analíticos de mérito dos métodos de quantificação 44
5.4.1 Linearidade 44
5.4.2 Limites de detecção e quantificação 45
5.5 Determinação das concentrações dos compostos bioativos nas amostras dos extratos obtidos com NaDES 46
6 CONCLUSÃO 49
7 REFERÊNCIAS 51
8 ANEXO 58

1 INTRODUÇÃO

Os solventes eutéticos profundos (DES, do inglês “deep eutectic solvent) surgiram como uma alternativa verde para substituir os solventes orgânicos que acabam gerando resíduos tóxicos e perigosos para o meio ambiente. Além de serem formados por reagentes menos tóxicos e mais baratos, sua síntese é simples, necessitando apenas de agitação e aquecimento. Em sua maioria, os DES são formados por compostos inorgânicos, porém, estudos mais recentes utilizam de ácidos orgânicos, aminoácidos, entre outros para deixar esses solventes mais verdes, sendo esses conhecidos como solventes eutéticos profundos naturais (NADES, do inglês “natural deep eutectic solvent”).

Os NADES são formados pela interação entre uma molécula capaz de doar ligação de hidrogênio (HBD, do inglês “hidrogen bond donor”) e outra capaz de aceitar (HBA, do inglês hydrogen bond aceptor”), fazendo com que tenha uma ampla quantidade de compostos possíveis para formar esses solventes. Com isso, é importante o estudo das propriedades de cada reagente que irá compor esse solvente, pois é possível a formação de NADES hidrofóbicos ou hidrofílicos, o que torna viável a extração de diversos compostos com características químicas distintas.

Um exemplo é o de NADES é feito através da interação entre o formado por mentol e o ácido caprílico, dois compostos de caráter natural que separados apresentam diversos benefícios para o corpo humano. Por ser composto formado por duas moléculas hidrofóbicas, esse NADES apresenta propriedades extratoras para compostos mais apolares, podendo ser utilizado na extração de diversos compostos orgânicos. Entre eles, uma classe que tem grande interesse para as indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos, são os compostos bioativos.

Dentro desses compostos bioativos, as duas divisões que mais se destacaram são os fenólicos e os carotenoides, por serem os grupos que mais possuem bioativos. Eles possuem diversas propriedades fitoterápicas, como ação antioxidante, anti-inflamatória e também de prevenção de diversas doenças, o que faz com que sua extração seja bastante interessante, já que eles são facilmente encontrados em plantas, frutos e legumes.

Esses compostos podem ser encontrados em frutos como a maçã, por exemplo, possuem diversos fenólicos na sua composição, sendo que grande parte deles pode ser encontrada na casca e sementes, partes que geralmente são descartadas pelas indústrias. Além da maçã, a cenoura e a beterraba também possuem grande quantidade de bioativos e neles se

encontram um dos carotenoides mais conhecidos, o β-caroteno. Por se tratar de uma cadeia longa de carbonos conjugados, o β-caroteno apresenta uma grande atividade antioxidante, podendo até mesmo ser associado a prevenção de alguns tipos de câncer.

A FAO (do ingles “Food and Agriculture Organization of the United Nations”) estima que 50% da produção de frutas e legumes é desperdiçada em regiões do mundo como a América do Sul e a Ásia, podendo significar uma perda de 400 bilhões de dólares se somado mundialmente. Uma das formas de diminuir esse desperdício é através da utilização dessa parte desperdiçada é para extração de compostos bioativos, fazendo com que seja aproveitado ao máximo das produções. Um exemplo desse resíduo é a casca desses alimentos originada após a industrialização na produção de suco de maçã ou produção de conservas. Dessa forma, esse resíduo poderia ser usado como fonte de compostos bioativos para produção de extratos visando agregar valor comercial. Para isso, existem diversos métodos de extração, como o método sólido-líquido, o qual associado ao emprego de um solvente verde como o NADES sendo que a utilização de NADES é uma forma mais verde, sendo possível realizar uma extração simples de sólido líquido para isso pode ser uma alternativa muito interessante.

A técnica de extração sólido-líquido é muito simples de ser aplicado, porém, alguns parâmetros precisam ser otimizados para que se tenha uma melhor eficiência, a temperatura, o tempo e a proporção de sólido-líquido. Nesse sentido, o uso de ferramentas quimiométricas podem ser muito importantes para auxiliar nessas otimizações, trazendo as vantagens de reduzir o número de experimentos e permitindo avaliar a interação entre os parâmetros estudados.

Com isso, o objetivo deste trabalho foi sintetizar e caracterizar o NADES formado por mentol e o ácido caprílico e aplicá-lo na extração de compostos bioativos, como os fenólicos de casca de maçã e o β-caroteno, de cascas de cenoura e beterraba de resíduos gerados pela indústria alimentícia.

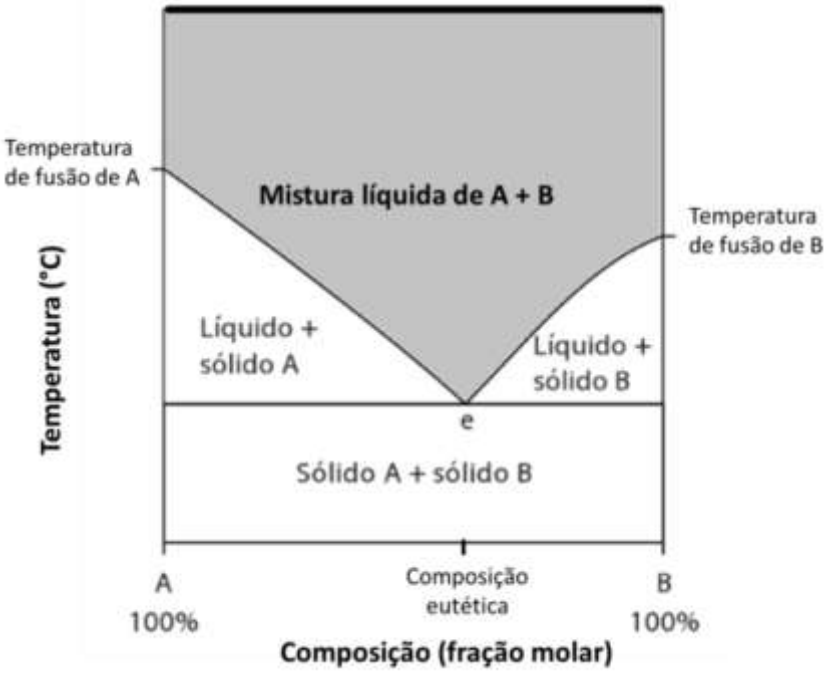
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS

O primeiro relato dos DES foi descrito por Abbot em 2003 (Abbott et al., 2004) com a mistura de cloreto de colina (ChCl) e diferentes sólidos, onde formaram uma solução com ponto de fusão muito mais baixo do que o de cada sólido separadamente (Abbott et al., 2004). Esses solventes são, geralmente, formados através da mistura entre dois sólidos, sendo um deles um o doador de ligação de hidrogênio (HBD, do inglês hydrogen bond donor) e o outro aceptor de ligação de hidrogênio (HBA, do inglês hydrogen bond accpetor).

Por definição, um ponto eutético, que origina o nome destes solventes, ocorre quando dois compostos são misturados em uma proporção exata e submetidos a aquecimento por um determinado tempo a uma dada temperatura (em sua maioria sólidos) em uma proporção exata, resultando em um solvente com uma diminuição de seu ponto de fusão e ebulição e menores que seus componentes individuais. Essa diminuição ocorre devido as interações das ligações de hidrogênio ou interação de Van der Walls entre o HBA e o HBD. A Figura 1 mostra o diagrama de fases de uma mistura eutética e o ponto eutético.

Figura 1. Diagrama de fases de uma mistura eutética indicando os limites entre as fases sólidas e líquida, sendo o ponto eutético indicado por "e".



Fonte: (de Sales et al., 2018).

Nesse diagrama é possível observar que separados, os sólidos A e B separados possuem temperaturas de fusão mais altas do que na mistura, portanto, eles não interagem entre si. Porém, na composição eutética, o ponto de fusão dos sólidos diminui, resultando em uma mistura líquida homogênea composta por A+B. Um exemplo para ilustrar esse sistema disso pode ser representado pela formação de um DES a partir da mistura de é a interação entre o ChCl e a ureia, onde seus pontos de fusão individuais são 302 e 133 °C, respectivamente. Enquanto isso, o DES resultante da mistura desses componentes, porém quando misturados, o resultado é um líquido com ponto de fusão de 12 °C (Longo & Craveiro, 2018).

Além do ponto de fusão, outras propriedades físico-químicas, como a viscosidade e a densidasde, desses DES são muito importantes de serem avaliadas, pois irão afetar as interações com os compostos de interesse quando esses solventes são empregados em métodos de extração.

2.1.1 Propriedades físico-químicas dos DES

O preparo dos DES seja é muito simples exigindo apenas a mistura dos componentes e aquecimento sob agitação por alguns minutos. Porém, uma vez formados os DES apresentam características muito diferentes entre si, já que existem várias opções de combinações de reagentes e proporções entre eles, podendo variar muito sua viscosidade, sua densidade e sua toxicidade. Essa diversidade de características, que aumentam as possibilidades de possíveis aplicações dos DES.

Dessa maneira, a caracterização através de técnicas como o Infravermelho (IV), Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-H), viscosidade e calorimetria exploratória diferencial (DSC, do inglês diferencial scanning calorimetry), possibilita a escolha das propriedades mais adequadas para a extração de diferentes analitos e aplicações em diversos métodos analíticos (Ma et al., 2018). Na Tabela 1 abaixo estão apresentados exemplos de DES apresentados na literatura e suas principais características físico-químicas.

Tabela 1. Composição e propriedades de diferentes DES/NADES.

Aceptor de ligação de Hidrogênio	Doador de ligação de Hidrogênio	Proporção molar	Densidade (g/cm^3)	Viscosidade (cP)	T_f (°C)	Referência
ChCl	ureia	1:2	1,21	750	12	(Longo & Craveiro, 2018)
	glicerol	1:2	1,18	37	-40	(Longo & Craveiro, 2018)
$ZnCl_2$	ureia	1:3,5	1,63	11340	9,0	(Longo & Craveiro, 2018)
DL-mentol	Ácido octanóico	1,5:1	0,888	7,80	-2	(Makoś et al., 2020b)
Timol	Ácido láurico	1,2:1	0,917	5,10	25	(Makoś et al., 2020b)
Ácido dodecanoico	Ácido octanoico	1:3	0,904	8,22	9,0	(Makoś et al., 2020b)

Observando a tabela é possível perceber que a propriedade que mais varia é a viscosidade, a qual que está relacionada a uma longa rede de ligações de hidrogênio entre o HBA e o HBD, e diminui a mobilidade das espécies livres de DES (Makoś et al., 2020b). Os menores valores de viscosidade são observados quando se usa compostos orgânicos, como o mentol e os ácidos orgânicos (Makoś et al., 2020a).

Por se tratarem de misturas eutéticas, a proporção molar entre os compostos precisa ser estudada, pois como é possível observar na Figura 1, apenas com a fração molar exata de cada componente, se tem a formação do ponto eutético. Por isso que existe uma variação entre os diferentes DES/NADES apresentados na Tabela acima. Em relação a temperatura de fusão, é favorável que sejam abaixo de 20 °C, para não precisar de fontes externas de aquecimento para sua formação.

Outra propriedade físico-química importante de ser estudada, não apresentada na tabela, é a hidrofilicidade dos DES, já que a extração dos compostos de interesse depende da sua interação com o solvente (Deng et al., 2019; Ji et al., 2020; Qu et al., 2019). Em sua maioria,

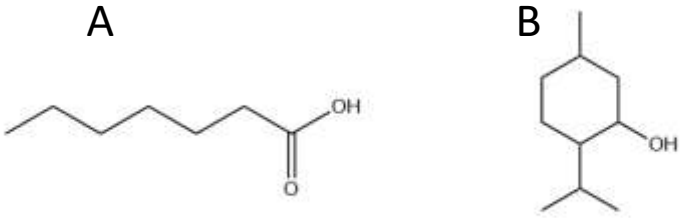
os solventes são hidrofílicos, porém isso limita a extração apenas a matrizes aquosas e compostos polares (Makoś et al., 2020b). Porém, existem alguns estudos empregando NADES hidrofóbicos, que têm grande importância, pois permitem a extração de compostos apolares com esses solventes verdes e ambientalmente amigáveis, sendo uma vantagem em relação aos solventes orgânicos convencionais, seja na parte de preparo de amostras em métodos analíticos, seja na produção de extratos visando aplicações industriais (Cao et al., 2017).

2.1.2 Solventes eutéticos profundos naturais

Com o objetivo de deixar os métodos analíticos mais verdes Choi e colaboradores (Choi et al., 2011) sugeriram a utilização de compostos naturais na formação dos DES, podendo ser por exemplo, aminoácidos, carboidratos, aminas, açúcares, entre outros (Choi et al., 2011). A formação do NADES ocorre da mesma maneira que os DES, porém eles podem ser preparados na presença de água, o que faz com que a viscosidade da solução final seja bem mais baixa quanto comparada com líquidos iônicos e os DES (Cunha & Fernandes, 2018). Geralmente no preparo são utilizados aminas e aminoácidos como HBA e ácidos orgânicos e carboidratos com HBD (Cunha & Fernandes, 2018).

Um exemplo de NADES é a mistura do ácido caprílico com o mentol, sendo eles um ácido graxo e um álcool, respectivamente. A Figura 2 apresenta a estrutura de ambos os compostos.

Figura 2. Estrutura molecular do ácido caprílico (A) e mentol (B).



Fonte: próprio autor

Por ser um ácido graxo, o ácido octanoico está relacionado a muitos benefícios para a saúde, como por exemplo a diminuição da chance do risco de câncer e doenças cardíacas, entre outras (Alonso-Esteban et al., 2023; de Cock et al., 2023; Rahrovani et al., 2018). O mentol por sua vez é bastante utilizado na indústria alimentícia, de fármacos e cosméticos (Soleimani et al., 2022). Estudos também mostram que a utilização do mentol pode ter efeitos ergogênicos para atletas de alta performance, quando consumidos através de géis ou até mesmo bebidas

(Vogel et al., 2022). Porém, para elucidar se esses benefícios individuais se mantêm no NADES, são necessários mais estudos. Ambas as moléculas são formadas por cadeias carbônicas, o que faz com que elas tenham características mais apolares, portanto, o NADES formado de sua interação também vai apresentar características semelhantes. Com isso, é possível a utilização desse solvente para a extração de moléculas orgânicas, entre eles estão compostos bioativos como diversos fenólicos e carotenoides (Sas et al., 2019).

2.2 COMPOSTOS BIOATIVOS

Compostos bioativos por sua vez são produzidos em plantas como metabólitos secundários, e sua utilização pode ser datada desde tempos da Roma e Grécia antigas, mesmo que na época não se tinha o conhecimento atual do que eram (Azmir et al., 2013). Estudos atuais relacionam a utilização desses compostos como benefícios no tratamento de diversos problemas, como por exemplo, doenças anti-inflamatórias, antialérgicas, e também atividade antiviral e antimutagênico (Bandeira et al., 2022; Rakha et al., 2022).

Esses compostos podem ser divididos em três categorias, fenólicos, terpenos e alcaloides, sendo que dentro delas existem outras classes de divisão para essas moléculas (Azmir et al., 2013). A Tabela 2 apresenta a estrutura de alguns compostos pertencentes a cada classe, juntamente com algumas características físico-químicas.

Tabela 2. Exemplos de compostos pertencentes a cada classe de bioativos e valores de Log p e pKa.

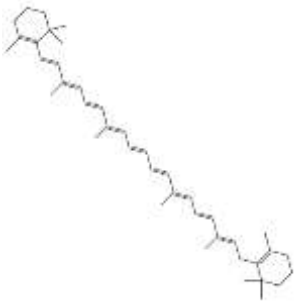
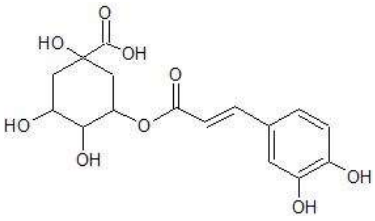
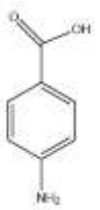
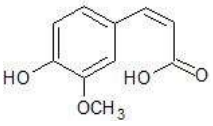
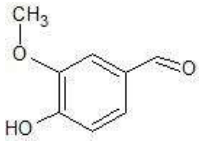
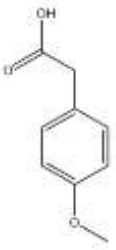
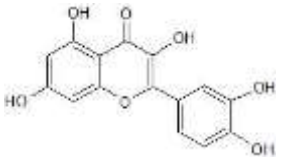
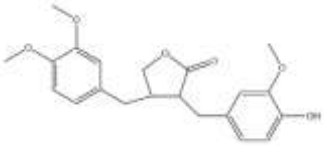
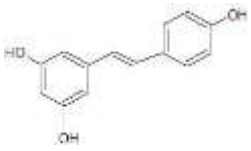
Analito	Log p	pKa	Estrutura	Classe
β-caroteno	17,62	-		Terpenos
Ácido clorogênico	-0,27	3,33 9,21 12,47 13,15 13,84 15,05		Fenólicos
Ácido 4-aminobenzóico	0,83	2,38 4,85		
Ácido ferúlico	1,5	3,58 9,98		Fenólicos
Vanilina	1,37	7,4		Alcalóides
Ácido metoxifenilacético	1,4	4,12		Fenólicos

Tabela 2. *Continuação.*

Analito	Log p	pKa	Estrutura	Classe
Quercetina	2,16	6,38 7,85 8,63 10,29 12,82		Flavonóide
Arctigenina	2,47	9,95		Lignano
Resveratrol	3,1	8,49 9,13 10,14		Estibeno

Por mais que sejam moléculas distintas entre si é possível perceber que todas possuem ligações conjugadas, e isso está relacionado a suas propriedades fitoterápicas que serão discutidas nos próximos tópicos. Das três categorias mencionadas, o foco do trabalho será em cima nos compostos fenólicos e terpenos, pois são os que possuem mais compostos bioativos.

2.2.1 Carotenoides

Uma das maiores classes dentro dos terpenos são os carotenoides, conhecido por serem corantes naturais com propriedades fitoterápicas e de grande interesse nutricional e médico (Castro et al., 2021; Yao et al., 2021). A principal característica dessa divisão é de moléculas com cadeias de mais de 40 carbonos e dupla ligações conjugadas, o que fazem com que elas apresentem propriedades antioxidantes devido a interação com radicais livres (Yao et al., 2021). O composto D da Figura 3 acima é um exemplo de carotenoide, o β-caroteno.

Por se tratarem de compostos naturais, esses bioativos podem ser encontrados em diferentes frutas e legumes, como a beterraba, uva, cenoura, tomate, entre outros. O licopeno por exemplo, pode ser encontrado no tomate em uma faixa de 70 a 130 mg kg^{-1} dependendo do

fruto (Londoño-Giraldo et al., 2021). Já a cenoura, é o vegetal mais rico em β-caroteno, sendo bastante utilizada para a extração do carotenoide (Battino et al., 2023).

2.2.2 Compostos fenólicos

A principal estrutura desses compostos é um anel aromático ligado a um grupo hidroxila. Os polifenóis podem ser divididos em flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos e estibeno.

A diferença entre os grupos é principalmente o número de anéis aromáticos e as estruturas que estão ligadas a cada anel. Esses ligantes podem variar desde cadeias carbônicas simples a aminas, ácidos orgânicos, lipídeos entre outros, fazendo com que a classe de fenólicos possua grande variedade de compostos (Li et al., 2014a)

Esses compostos em sua maioria podem ser encontrados de forma natural, sendo o maior grupo de fitoquímicos, podendo ser encontrado em diversas plantas e frutos (X. Fu et al., 2022). Devido a sua abundância, existem diversos estudos relacionando os bioativos com o tratamento e prevenção de diversas doenças, fazendo com que eles tenham um grande interesse para aplicação nas indústrias de cosméticos, terapêuticas e de alimentos (X. Fu et al., 2022; Soleimani et al., 2022). A Figura 4 mostra os usos dos compostos fenólicos no tratamento de doenças.

Figura 3. Diagrama indicando os principais usos de compostos fenólicos para o tratamento de diferentes doenças.

Fonte: adaptado de (Li et al., 2014b).

Um exemplo de fruto contendo polifenóis é a uva, que além de suas propriedades antioxidantes, também dão sabor, aroma, cor e frescor para o suco (Guler, 2023). Também é possível encontrar diversos fenólicos em plantas como a menta e o tomilho, que são os ingredientes mais utilizados em chás e tisanas (Soleimani et al., 2022). Outro fruto bastante rico em bioativos é a maçã, que possui diferentes fenólicos em sua composição, por exemplo, os ácidos cinâmico, ferúlico e clorogênico, e diferentes flavonoides (Dadwal et al., 2023; Patocka et al., 2020).

Os frutos mencionados possuem valores nutricionais significativos, o que justifica sua produção em larga escala. No entanto, é importante considerar que há um potencial elevado de desperdício desses frutos, já que muitas partes, como sementes, cascas e raízes, são frequentemente descartadas (Jayesree et al., 2021). Contudo, essas partes poderiam ser reaproveitadas para extração dos compostos bioativos, para assim ter um reaproveitamento desses resíduos gerados pela indústria e diminuir esse impacto ambiental, social e agregar valor comercial.

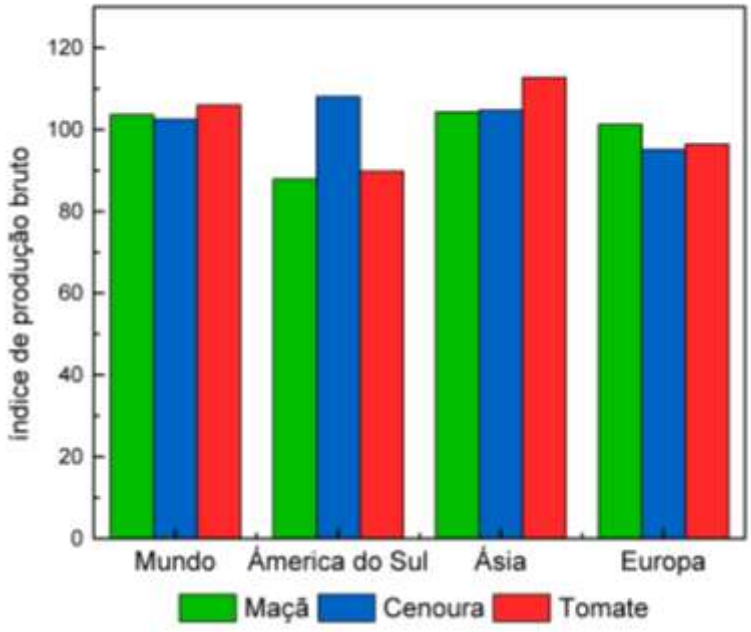
2.3 RESÍDUOS DA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA E USO DE DES NA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

O desperdício de alimento pode ser dividido em dois termos, em perda e descarte de alimentos. De acordo com a FAO, perda de comida está relacionada a diminuição de massa ou valor nutricional do alimento que seria destinado ao consumo humano. Enquanto que descarte de comida, se refere ao alimento apropriado ao consumo humano que foi descartado (Food and Agriculture Organization of the United Nations. & Food Wastage Footprint (Project), 2013).

Estima-se que o desperdício de comida anual é equivalente a um terço da produção mundial, o que dificulta a estabilidade alimentícia e pode causar diversos problemas ambientais (Food and Agriculture Organization of the United Nations. & Food Wastage Footprint (Project), 2013). De acordo com a Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (do inglês “UN Environment Programme”), o valor econômico perdido devido a essa perda pode ser estimada em 400 bilhões de dólares (Kumar et al., 2022). Com isso a reutilização desses produtos é de extremo interesse, sendo que existem estudos que utilizam dessa matéria orgânica para criação de biocombustíveis e biofertilizantes (Kumar et al., 2022), ou até mesmo para extração de compostos bioativos, como aqueles mencionados anteriormente (Jayesree et al., 2021; Mirheli & Taghian Dinani, 2018).

Pela FAOSTAT o índice bruto de produção de frutas e vegetais mundial em 2020 foi de 107,69 (índice de 2014-2016 = 100), onde grande parte desse produto é perdido durante os processos industriais, devido a fatores como ineficiência no processo, variações de temperatura, rejeição devido a padrões de qualidade, entre outros (Jeswani et al., 2021). A Figura 3 abaixo mostra a produção bruta de algumas frutas e vegetais na América do Sul e entres regiões do mundo.

Figura 4. Valores de produção bruta para a maçã, cenoura e tomate em 3 regiões do mundo. (Índice utilizado 2014-16 = 100).



Ao analisar o gráfico é possível perceber que a produção de frutas e vegetais cresceu no mundo, comparando com o índice de 2014-16, porém grande parte dessa produção é perdida ou descartada, podendo chegar a valores acima de 50% dependendo da região (English & Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2019).

Mesmo com diversos estudos sobre o reaproveitamento dessa matéria orgânica, a utilização para extração de compostos bioativos é pouco explorada devido à dificuldade disso. A extração desses compostos é mais explorada em métodos de preparo de amostras empregando DES como um solvente alternativo mais barato e simples visando a determinação desses compostos em amostras de alimentos (Jayesree et al., 2021).

Diversos estudos utilizam de DES e NADES como solvente extrator, com o objetivo de substituir os solventes orgânicos tóxicos para aqueles mais verdes ao meio ambiente (Florindo et al., 2020; Panić et al., 2019). A Tabela 4 abaixo apresenta algumas técnicas de

preparo de amostra que utilizaram dos DES/NADES para extração de compostos bioativos em diferentes matrizes.

Tabela 3. Exemplos de técnicas de preparo de amostra utilizando DES/NADES como solvente extrator para extração de compostos bioativos.

Solvente eutético profundo	Técnica de extração	Analito	Matriz	Limite de Detecção ($\mu g\ L^{-1}$)	Referência
Cloreto de colina: 1,4-butenodiol	LPME	Flavonoides	Folhas	7,0	Bi et al., 2013
Mentol: Ácido acético	DLLME	Ésteres de ácidos ftálicos	Água mineral e de torneira	6,6-18	Ortega-Zamora et al., 2020
Cloreto de colina: Fenol	SPE	Polifenóis	Palmeiras	nd	N. Fu et al., 2017
	DLLME	Cafeína	Bebidas	3-5	Shishov et al., 2019
Cloreto de tetrametilamonio: etileno glicol	M-D-μSPE	Flavonoides	Cebola e chá verde	0,2-32,96	Majidi & Hadjmohammadi, 2019

Através da tabela acima é possível perceber que existem várias técnicas utilizando de DES para extração de compostos bioativos. Também é possível analisar que através da utilização de diferentes solventes, foi possível extrair analitos com polaridades diferentes em matrizes sólidas e líquidas, algo que possivelmente com solventes convencionais não seria tão simples e não teria valores de limite de detecção tão baixos.

As técnicas apresentadas acima também surgiram como alternativa mais verde para as extrações, pois elas são técnicas miniaturizadas, que utilizam bem menos solvente e atingindo o mesmo, ou até maior, rendimento que outras técnicas (Yamini et al., 2019). Mesmo apresentando uma maior eficiência, ainda são técnicas mais caras já que elas necessitam de dispositivos complexos para a extração (Badawy et al., 2022). Outra limitação seria que em

alguns casos elas não são tão reprodutíveis, já que trabalham com volumes bem pequenos e dependem da precisão do analista (Kannouma et al., 2022).

Porém, a produção de extratos contendo compostos bioativos a partir desses resíduos da indústria alimentícia empregando NADES e métodos clássicos como a extração sólido-líquido podem ser uma estratégia alternativa interessante. Com isso, o objetivo desse estudo é a caracterização e aplicação de um NADES composto por ácido caprílico e mentol, para a extração sólido líquido de compostos bioativos em resíduos da indústria alimentícia.

3 OBJETIVOS

3.1OBJETIVO GERAL

Preparar, caracterizar e aplicar o NADES composto por mentol e ácido caprílico na extração de compostos fenólicos e β-caroteno de resíduos da indústria alimentícia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar o solvente eutético profundo a partir de mentol e ácido caprílico;
- Caracterizar o solvente eutético profundo incluindo análises de IV, RMN, TGA, DSC, entre outras;
- Otimizar os parâmetros de extração sólido-líquido dos compostos de interesse com o DES a partir dos resíduos da indústria alimentícia, incluindo proporção de amostra e DES, tempo de extração, temperatura de extração, entre outros, empregando planejamento de experimentos;
- Avaliar os parâmetros analíticos de mérito dos métodos de quantificação e determinar as concentrações dos compostos bioativos nas amostras dos extratos obtidos com NADES.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os reagentes e solventes utilizados foram todos de grau analítico. Para o preparo do DES foi utilizado ácido caprílico 98% e mentol 95% ambos adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil).

Para os métodos de LC foram utilizados metanol 99% (SK Chemicals, São Paulo, Brasil), ácido fórmico 96% (Tedia, São Paulo, Brasil), Acetonitrila (Dinâmica, São Paulo, Brasil) e água filtrada por um sistema Mili-Q.

As soluções padrões dos carotenoides foram preparadas diariamente a partir de uma solução estoque de 1000 mg L^{-1}, para as eventuais diluições era utilizado etanol 99% (SK chemicals, São Paulo, Brasil).

As análises de RMN-H foram feitas utilizando o solvente de $CDCl_3$ 99,8% (Tedia, São Paulo, Brasil).

4.2 INSTRUMENTAÇÃO E MÉTODOS UTILIZADOS

4.2.1 Instrumentação

A pesagem das massas de mentol e extrato foi realizada utilizando uma balança analítica do modelo AX32008 (Shimatzu, Quioto, Japão).

Para a extração dos compostos e o estudo do planejamento de experimentos foi utilizado um agitador magnético com aquecimento da marca Velp Scientifica. Após a extração, foi utilizada uma micro-centrífuga da marca MiniSpin Plus para separar fases, sendo coletado apenas o sobrenadante. Para a casca da cenoura e da beterraba foi utilizado um liofilizador do modelo micro modulyo (Edwards, São Paulo, Brasil).

Às análises foram realizadas em um LC modelo 1200 (Agilent Technologies, Waldbronn-BW, Alemanha). O sistema de HPLC estava acoplado a um espectrofotômetro de massas híbrido triplo quadrupolo/trap (Q Trap 3200 Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord-ON, Canada). As análises foram realizadas no modo de ionização por eletrospray negativo (Turbo Ion Spray Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord-ON, Canada). Os parâmetros utilizados no MS estão descritos no apêndice A2). Para análise dos dados foi utilizado o software Analyst (1.5.1).

As análises de DSC foram realizadas em um calorímetro DSC Q2000 (TA Instruments, New Castle, EUA) equipado com um sistema de resfriamento RCS90. Para as amostras de TGA foi utilizado o equipamento Shimadzu com um módulo TGA-50.

A viscosidade foi determinada utilizando o equipamento do Laboratório de Controle de Processos de Polimerização do departamento de engenharia química e de alimentos da UFSC, reômetro HAAKE MARS II (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), e para manter a temperatura foi utilizado banho refrigerado HAAKE DC30-K10 com circulador de imersão (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). A densidade e o índice de refração

foram determinados utilizando o equipamento do Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais do departamento de química da UFSC, Lovis 2000 M (Anton Parr, São Paulo, Brasil).

O equipamento utilizado no IV foi o Spectrum Two (PerkinElmer®, Massachusetts, USA). As análises de RMN-H foram realizadas no equipamento NMR AS 400 da Varian®. Elas foram realizadas com parceria da Central de Análises da UFSC.

Para o preparo do extrato do resíduo industrial da maçã foi utilizado uma estufa (SOLAB, São Paulo, Brasil), e após a secagem um moinho analítico (A11 Basic, IKA, Staufen, Alemanha). Para padronizar a granulometria foi utilizado um peneirador eletromagnético (I-1016-B, PAVITEST).

4.2.2 Determinação dos fenólicos por LC-MS/MS

As determinações dos compostos fenólicos foram feitas seguindo o método descrito por Schulz et al., 2015 com modificações. Foi usada uma coluna Synergi (4,0 μm, 2,0 × 150 mm; Phenomenex, Torrance-CA, EUA), separação em uma vazão de 250 μL min^{-1} e fases móveis constituídas por 95:5 % (metanol: água) (fase A) e 0,1% de ácido fórmico em uma solução aquosa (fase B). O modo de eluição por gradiente usado foi adaptado e está apresentado na Tabela 5.

Tabela 4. Gradiente de eluição utilizado para análise dos compostos fenólicos.

Tempo (min)	fase A (%)	fase B (%)
5	30	70
7	90	10
10	90	10
13	30	70

Uma alíquota de 250 μL do extrato a ser avaliado foi transferido para um microtubo de 1,5 mL, adicionou-se 1,25 mL de etanol, centrifugou-se por 10 min a 14000 rpm. Um volume de 250 μL do sobrenadante foi diluído com 250 μL de etanol em vial de 1,5 mL e reservado para injeção no sistema de LC-MS/MS.

As massas de íon precursor e fragmentos de identificação usados no MS/MS foram os mesmos descritos por (Schulz et al., 2015).

4.2.3 Determinação de β-caroteno por LC-DAD

A determinação do β-caroteno foi seguindo o método de Szabo et al., 2021 com modificações. O HPLC utilizado foi o mesmo para o método acima, porém acoplado a um detector de arranjo de diodo, onde os compostos foram analisados em um comprimento de onda de 450 nm. A coluna utilizada foi a XDB Eclipse C18 (5,0 μm, 4,6 × 150 mm; Agilent, Santa Clara-CA, EUA), com uma vazão de 0,8 mL min^{-1} e o volume de injeção de 10 μL, utilizando como fases móveis A 95:5% (acetonitrila: água) e B acetado de acetila, em ambas as fases foi adicionado 0,25% de trietilamina

O gradiente utilizado para a separação é apresentado na Tabela 5. Para análise dos dados foi utilizado o software Chemstation (0.4.3).

Tabela 5. Gradiente de eluição utilizado para análise dos compostos carotenoides.

Tempo (min)	Fase A (%)	fase B (%)
0	90	10
10	50	50
13	40	60
20	10	90
23	90	10

Para quantificação, foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item 4.2.1, porém para a casca de cenoura foi adicionado um volume de 3 mL de etanol após a extração, sendo coletado 50 uL e diluído para 5 mL com etanol.

4.3 PREPARO DO NADES

O preparo do NADES foi baseado em Fan et al. (2021) utilizando a proporção molar de 1:1 de ácido caprílico: mentol. A solução foi preparada diariamente sendo pesado 5g de mentol e misturado com 5,2 mL de ácido caprílico em um Erlenmeyer de 125 mL. Em seguida, o Erlenmeyer foi levado para a estufa a 80 ºC por 30 min até atingir a formação de um líquido homogêneo. O NADES preparado foi armazenado em temperatura ambiente por até 7 dias para a utilização nas extrações.

4.2.4 Resíduo industrial do suco da maçã

O extrato obtido através dos resíduos gerados na indústria da maçã foi preparado primeiramente secando por 24h a 41,4± 1,8 °C e em seguida o material foi triturado. Após isso, a granulometria foi padronizada utilizando um peneirador eletromagnético com uma abertura de 850 μm (20TY). O item 4.5 descreve como foi realizada a extração dos fenólicos.

Para extração dos fenólicos foi utilizado o resíduo industrial do suco de maçã utilizando as variedades Fuji e Gala, cultivadas na região de São Joaquim- SC/Brasil. Para a extração dos compostos fenólicos foi utilizado o resíduo industrial da produção do suco de maçã das variedades Fuji e Gala misturadas, cultivadas na região de São Joaquim- SC/Brasil. O preparo do extrato está descrito no item 4.2.2.

4.2.5 Resíduo de casca de legumes

Para o preparo do extrato primeiramente foram retiradas a casca de ambos os legumes para a quantificação do composto bioativo. Após a retirada, a casca foi congelada com nitrogênio líquido e colocada em freezer a -20 °C para posterior liofilização. Depois de 18h de liofilização, a amostra seca foi triturada utilizando um moinho de hélices, pesado 0,5 g em um frasco de vidro e adicionado 1 mL de NADES para a extração. A extração foi realizada utilizando o mesmo procedimento descrito para o item 4.5.

Para a extração do β-caroteno foi escolhido duas diferentes matrizes, a cenoura e a beterraba, ambas foram compradas em mercados locais. O preparo do extrato está descrito no item 4.2.3.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO DES

Para a caracterização do NADES foram utilizadas as técnicas de DSC, TGA, ensaio microbiológico, viscosidade, densidade, índice de refração, IV e RMN-H.

4.4.1 DSC E TGA

Para caracterização das transições térmicas, entalpias e estabilidade térmica foram utilizadas as técnicas de DSC e TGA. Durante as medições do DSC, uma taxa de aquecimento/resfriamento de 10 °C min^{-1} e um fluxo de nitrogênio de 40 mL min^{-1} foram empregados.

A estabilidade térmica foi investigada por TGA usando um com uma taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} e um flufoi xo de nitrogênio de 50 mL min^{-1}.

4.4.2 Ensaio microbiológico do DES

A metodologia do ensaio microbiológico seguiu o método de (Huang et al., 2017). Para isso duas bactérias Gram-positivas (S. Aureus (ATCC 29213), E. Faecalis (ATCC 29212) e duas Gram-negativas (E. Coli (ATCC 25922), P. Aeruginosa (ATCC 27853) foram utilizadas para avaliar a toxicidade do NADES. As cepas testadas foram incubadas em mei. Um papel de filtro estéril de 6 mm foi embebido com NADES e equilibrado por 12 h antes de aplicar nas placas semeadas. As placas foram cultivadas a 37 °C por 24 h, e então os diâmetros das zonas de inibição foram medidos (n=2). Um controle foi realizado submetendo o papel filtro estéril sob as mesmas condições de análise para cada cepa testada.

4.4.3 Viscosidade, densidade e índice de refração

A viscosidade dinâmica média foi determinada utilizando geometria de placas planas de medição com 60 mm de diâmetro, fenda de 0,3 mm, com taxas de cisalhamento de 0,1 a 500 s^{-1} por 200 s a uma temperatura constante de 20 °C.

Para as medições da densidade e índice de refração foram utilizados 2 mL de NADES, no qual foi inserido diretamente no equipamento previamente calibrado e a temperatura para as medições foi de 20 °C.

4.4.4 Infravermelho e RMN-H

As análises de IV e RMN-H foram feitas em laboratórios parceiros, sendo eles o IFSC e a central de análises da UFSC, respectivamente. Técnica para análises de IV foi a de Reflectância Total Atenuada Universal (Universal Attenuated Total Reflectance, UATR) na faixa de 4000 a 650 cm^{-1}. As análises de RMN-H foram realizadas utilizando clorofórmio deuterado como solvente.

4.5 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO.

Para otimização dos parâmetros de extração da casca da maçã, beterraba e cenoura, foi feito um planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central, para analisar em 3 níveis (-1, 0, 1) o fator tempo de extração (10, 20, 30 min), temperatura (25, 35, 45 °C) e proporção entre extrato: NADES (1:2, 1:6, 1:10 m/v). A Tabela 6 indica os níveis para cada fator utilizados para o planejamento. Foi utilizado metanol para avolumar os frascos em 2,5 mL antes da extração para evitar efeitos de diluição, considerando que o volume final iria variar dependendo da proporção escolhida.

Tabela 6. Parâmetros utilizados no planejamento de experimentos para os analitos Vanilina, ácido metoxifenilacético, ácido clorogênico, ácido ferúlico e ácido 4-aminobenzóico.

Experimento	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Proporção (m:v)
1	20	25	1:2
2	20	25	1:10
3	20	45	1:2
4	20	45	1:10
5	30	25	1:2
6	30	25	1:10
7	30	45	1:2
8	30	45	1:10
9	20	35	1:6
10	20	35	1:6
11	20	35	1:6

Depois de cada experimentos os tubos de eppendorf foram levados para centrífuga por 10 min a 14000 rpm para separação de fases. Então foi retirado o sobrenadante e transferido para um frasco e reservado para as determinações dos compostos fenólicos por LC-MS/MS. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, e o ponto central, em triplicata.

Após os resultados, foi realizado uma nova análise univariada com o tempo de extração, utilizando tempos de 30 a 120 min. A temperatura e a proporção foram mantidas constantes em 25 °C e 1:2 (m:v) respectivamente.

4.6 PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO E DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS COMPOSTOS BIOATIVOS NA AMOSTRAS DE EXTRATOS

Para a determinação dos analitos e dos parâmetros analíticos de mérito foram realizadas curvas de adição de padrão para cada analito. Para cada curva construída foram utilizados cinco níveis de concentração. Os parâmetros analíticos de mérito observados foram a linearidade, limites de detecção e quantificação.

Para a quantificação dos compostos fenólicos (vanilina, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido 4-aminobenzoico e o ácido metoxifenilacético) foi preparado uma mistura de padrões contendo os analitos em uma concentração de 100 mg L^{-1}. Essa solução estoque foi

usada nas diluições para preparação das curvas diariamente. As curvas de calibração por adição de padrão tiveram uma faixa de concentração adicionada que variou de 0 a 5 mg L^{-1}.

Na quantificação do β-caroteno nos extratos de casca de beterraba e cenoura foi usada uma solução estoque de 100 mg L^{-1}. Essa solução foi empregada na construção da curva de adição de padrão que variou de 0 a 3 mg L^{-1}. A curvas de calibração foi preparada diariamente para as determinações.

Os parâmetros analíticos de mérito foram analisados através da razão sinal ruído para os limites de detecção e quantificação, e a linearidade foi analisada através das equações de regressão linear das curvas de calibração.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PREPARO DO DES

Nesse trabalho foi utilizado o ácido caprílico e o mentol para a formação do NADES com o objetivo de produzir um solvente mais verde que os solventes orgânicos convencionais para a extração de compostos bioativos. Para seu preparo foi utilizado a proporção molar de 1:1 (ácido caprílico, HBD: mentol, HBA).

O NADES preparado se apresenta como um líquido de cor amarelada a temperatura ambiente com odor característico do mentol. Ele também aparenta ter uma viscosidade semelhante da água, sendo menos denso que ela. Por ser hidrofóbico, se misturado com a água, percebe-se a formação de duas fases bem distintas. Ao colocá-lo no freezer a -20 °C por 24h, o NADES congela, porém em 10 minutos volta a sua forma líquida na temperatura ambiente.

Para a caracterização do NADES foram utilizadas as técnicas de IV, RMN-H, TGA, DSC e analisados os parâmetros de viscosidade, densidade, índice de refração e toxicidade.

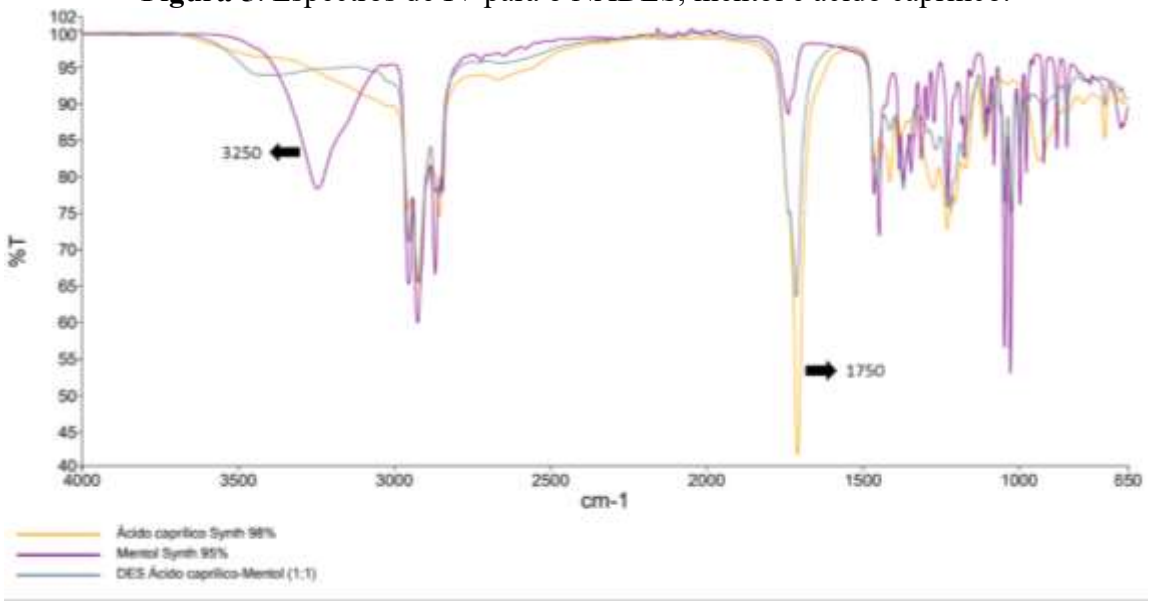
5.2 CARACTERIZAÇÃO DO NADES

Para caracterização do NADES foram utilizadas as técnicas de infravermelho, RMN'H, TGA, DSC e analisados os parâmetros de viscosidade, densidade, índice de refração e toxicidade.

5.2.1 Infravermelho

A caracterização do NADES foi feita comparando o espectro de IV do solvente com seus precursores, ácido caprílico e mentol (Figura 6).

Figura 5. Espectros de IV para o NADES, mentol e ácido caprílico.

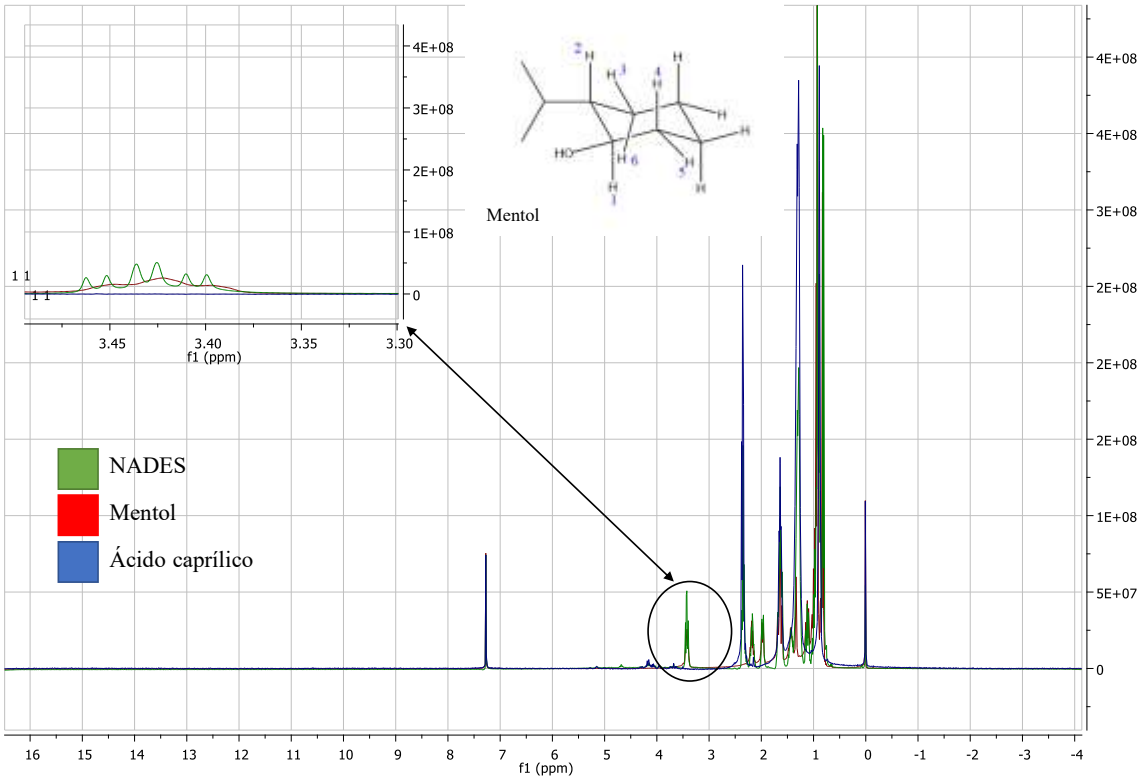


Através do espectro é possível analisar a presença de grupos funcionais e como eles se comportam antes e depois da formação do NADES. Ao comparar os espectros é possível verificar o deslocamento das bandas e/ou alteração na intensidade dos sinais, indicando a formação do NADES. Uma primeira evidência é o sinal em 1750 cm^{-1}, referente a ligação C=O de ácidos carboxílicos (Wiley et al., 2005). É possível observar uma diminuição na intensidade do sinal ao comparar o ácido caprílico com o NADES formado, que caracteriza a formação de uma ligação de hidrogênio, já que possivelmente tem uma conjugação da dupla ligação, diminuindo a intensidade do sinal referente a ligação C=O. Outra banda indicativa da formação do NADES é em 3250 cm^{-1}, referente ao estiramento vibracional do OH (Wiley et al., 2005). Ao comparar o sinal do mentol com o do NADES é possível observar que houve uma diminuição dessa banda OH, sugerindo também que possivelmente ocorreu a ligação entre o mentol com o ácido caprílico.

5.2.2 RMN-H

A técnica de RMN-H também foi usada para caracterizar a formação do NADES. Para isso foi obtido o espectro do mentol, ácido caprílico e NADES (Figura 7).

Figura 6. Análise de RMN'H para o solvente eutético (mentol:ácido caprílico), para o mentol e para o ácido caprílico.

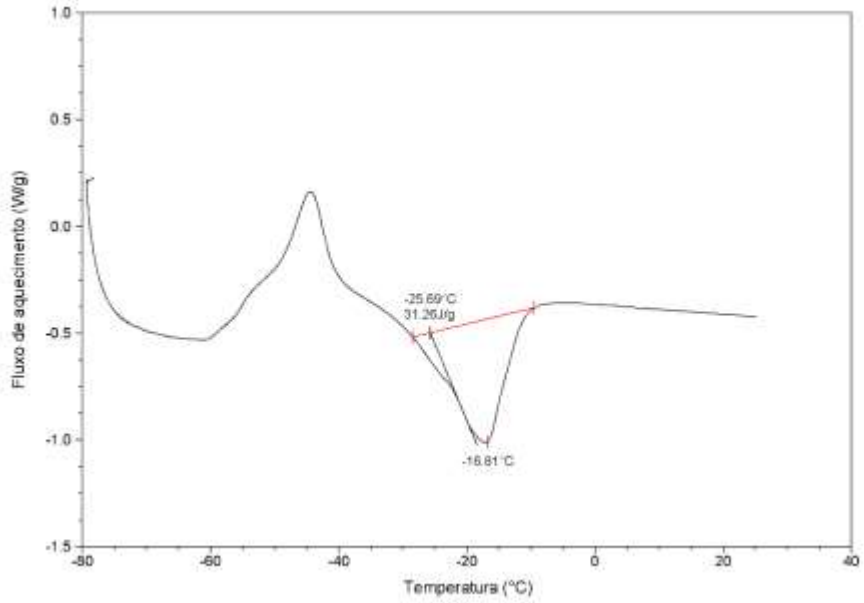


Através dessa técnica foi possível estimar as interações entre os átomos de hidrogênio nos compostos formadores do NADES. O sinal em 3,44 ppm do mentol e do NADES é referente ao acoplamento $J_{1,3}$ entre os hidrogênios 1-2 e 1-4 (representados na molécula de mentol inserida no gráfico). No sinal em vermelho, referente ao mentol, o acoplamento do H1 ocorre de forma livre, podendo interagir tanto com o H2 quanto com H4, resultando em uma resolução baixa desse sinal. Enquanto isso, no NADES a formação da ligação de hidrogênio entre o mentol e o ácido caprílico provoca um maior impedimento do H1, fazendo com que o acoplamento com os outros H seja melhor. Dessa maneira, o sinal em 3,44 ppm para o NADES (linha verde) está melhor resolvido, facilitando a observação de um duplo duplo dupleto.

5.2.3 Calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria

Foram realizadas as análises de DSC e TGA para caracterizar propriedades físico-químicas do NADES. Através da DSC é possível encontrar o ponto de fusão do solvente. O DSC do NADES está apresentado na Figura 8.

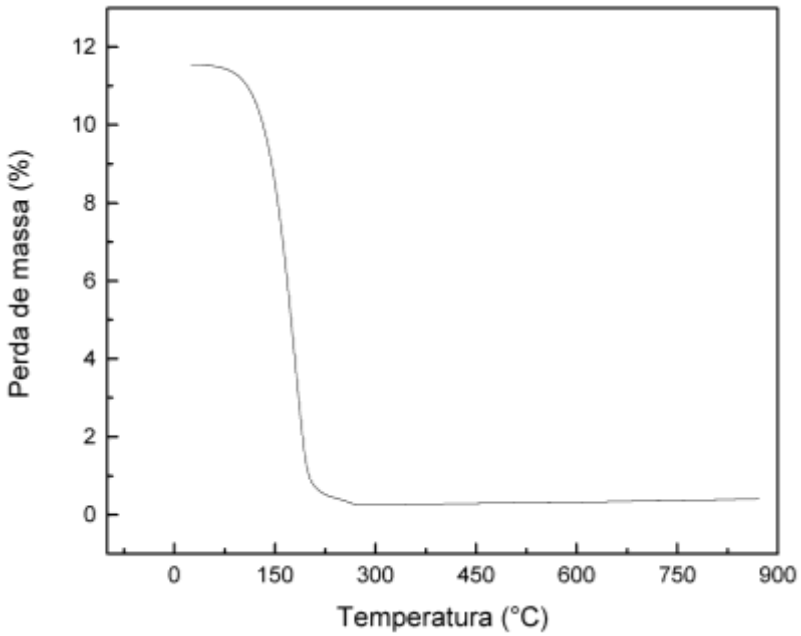
Figura 7. Diagrama de DSC para a análise do NADES preparado através do mentol e ácido caprílico.



Através do termograma é possível observar que o ponto de fusão do NADES foi de -16,81 °C. Os pontos de fusão do mentol e do ácido caprílico são 15,92 °C e 8,20 °C, respectivamente (Sas et al., 2019). Essa diferença indica que houve a formação do NADES, já que sua temperatura de fusão foi menor que a dos precursores. Essa técnica é importante, pois a diminuição do ponto de fusão fundamenta a caracterização desse tipo de solvente.

A técnica de TGA foi utilizada para determinação do perfil de degradação do NADES. Com isso, é possível analisar alguns parâmetros para a extração, pois através do TGA consegue-se saber a partir de qual temperatura o solvente começa a volatilizar ou se degradar. A Figura 9 apresenta a curva obtida.

Figura 8. TGA para o NADES preparado a partir de ácido caprílico e mentol.



Através do gráfico é possível perceber que a partir de 120 °C começa a ter uma perda de massa significativa, sendo que foi perdido cerca de 90% da massa do NADES até a temperatura de 200 °C. Isso indica que acima de 120 °C, esse solvente não é adequado para extração, considerando sua volatilização ou degradação.

.

5.2.4 Densidade, viscosidade e índice de refração

Outros parâmetros importantes a serem estudados são a densidade e a viscosidade, já que eles podem interferir na extração e nas determinações dos compostos por LC. Já o índice de refração é uma propriedade única de cada solvente, portanto é outro indicativo da formação do NADES proposto. Os valores experimentais obtidos para o NADES estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 7. Valores de densidade, viscosidade e índice de refração obtidos para o NADES formado por de ácido caprílico e mentol.

Parâmetro*	Experimental	Teórico**
Viscosidade dinâmica (mPa s^{-1})	16,81	15,88
Densidade (g cm^{-3})	0,9082	0,9053
Índice de refração	1,4471	1,4461

* n = 3, temperatura das medidas 20 ºC; ** Valores teóricos obtidos de Sas et al., 2019

Os valores determinados experimentalmente dos parâmetros foram muito próximos dos valores relatados na literatura. Ao analisar a viscosidade foi possível concluir que o NADES possui um baixo valor ao comparar com a viscosidade de outros DES apresentados na Tabela 2, o que pode facilitar a transferência de massa dos compostos de interesse de um sólido para o solvente durante a extração. Outra vantagem de uma baixa viscosidade é que foi possível utilizar do NADES diretamente nas análises de cromatografia sem a necessidade de preparos de amostra específicos antes das injeções no equipamento, uma vantagem para o procedimento de quantificação dos analitos.

A densidade do NADES é menor que a da água (1,000 g cm^{-3}, 20 ºC - Nunes et al., 2019) e com isso pode afetar o processo de extração, especialmente quando for um solvente imiscível na água. Isso decorre da etapa de recuperação do solvente após o processo de extração, na qual dependendo do frasco usado (tubo cônico) a recuperação do solvente mais denso que a água seria mais fácil de ser realizada por reunir o solvente no fundo do tubo. Entretanto, isso seria mais problemático se esse solvente fosse usado em técnicas de preparo de amostras que empregam microvolumes de solvente. Para o caso proposto deste estudo, o uso do NADES como solvente extrator, o fato da água fica na fase inferior seria até uma vantagem para remover qualquer quantidade residual que pudesse afetar o extrato produzido.

Quanto ao índice de refração, ele foi obtido pois é uma propriedade única de cada solvente, portanto através dele seria possível ter mais uma previsão da formação do NADES. Ao comparar com a literatura, o valor obtido foi bem próximo, indicando que houve a formação do solvente.

5.2.5 Ensaio microbiológico

Com o objetivo de analisar uma possível toxicidade do NADES, foi realizado um ensaio microbiológico com quatro tipos de bactérias, duas Gram-positivo e duas Gram-negativo. Para isso, foi analisada a formação do halo em volta do solvente em um ensaio microbiológico. Os resultados de diâmetro de zona de inibição medidos estão apresentados na Tabela 8. As imagens referentes a esse estudo podem ser encontras no apêndice A, mostrando o estudo referente a cada bactéria.

Tabela 8. Influência do NADES na inibição das bactérias.

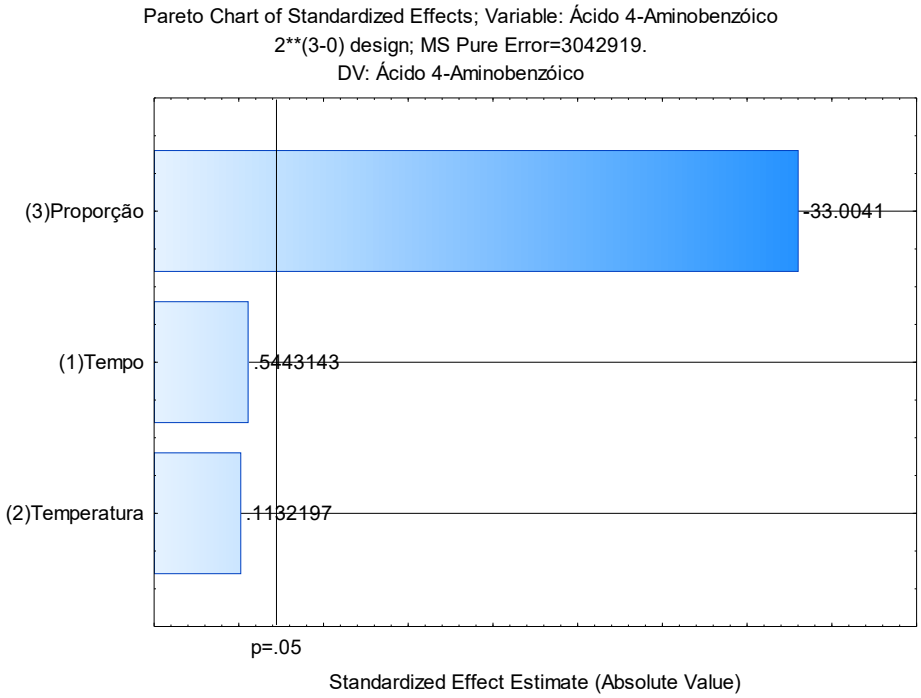
Bactéria	Diâmetro da zona de inibição (mm)
S. Aureus (gram-positiva)	11
E. Faecalis (gram positiva)	15
E. Coli (gram-negativa)	10
P. Aeuruginosa (gram-negativa)	16

Os resultados obtidos mostraram uma variação de 11 a 16 mm no diâmetro da zona de inibição (ZI). De acordo com Zhao et al., 2015, essa faixa pode ser considerada adequada considerando que para os DES/NADES do estudo, o a faixa da ZI variou de 11 a 24. Quanto maior a zona de inibição, uma maior toxicidade relativa pode ser atribuída ao solvente, pois indica que naquela área não houve o crescimento de bactérias. Porém, esses valores tendem a ser menores quando é realizada a diluição do solvente no decorrer dos ensaios. Além disso, vale ressaltar que esse estudo é qualitativo, pois não se tem dados que atribuam a toxicidade dos NADES ao tamanho diâmetro da zona de inibição. Portanto, de acordo com os ensaios é possível concluir que o solvente apresenta um baixo grau de toxicidade, pois teve a formação de uma ZI, porém por ser valores pequenos, ainda pode ser considerado um solvente biocompatível.

5.3 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS COM O DES A PARTIR DOS RESÍDUOS DA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA.

Para otimizar os parâmetros da extração para os fenólicos foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 (os detalhes estão apresentados no item 4.5). Após as determinações dos analitos nas diferentes condições experimentais, foi utilizado o Software *Statistica* para obtenção do gráfico de pareto e da tabela ANOVA para os compostos estudados. Os planejamentos foram avaliados com um grau de significância de 95% e foi utilizado um modelo matemático sem interações. As áreas dos picos dos analitos (ácido 4-aminobenzoico, vanilina, ácido clorogênico, ácido ferúlico e o ácido metoxifenilacético) no extrato de resíduo da indústria de suco de maçã foram utilizadas como resposta para a avalição do planejamento. Cada analito foi avaliado individualmente e o gráfico de pareto obtido para o ácido 4-aminobenzóico está apresentado na Figura 10.

Figura 9. Gráfico de pareto obtido através da área de sinal cromatográfico para o Ácido 4-aminobenzóico



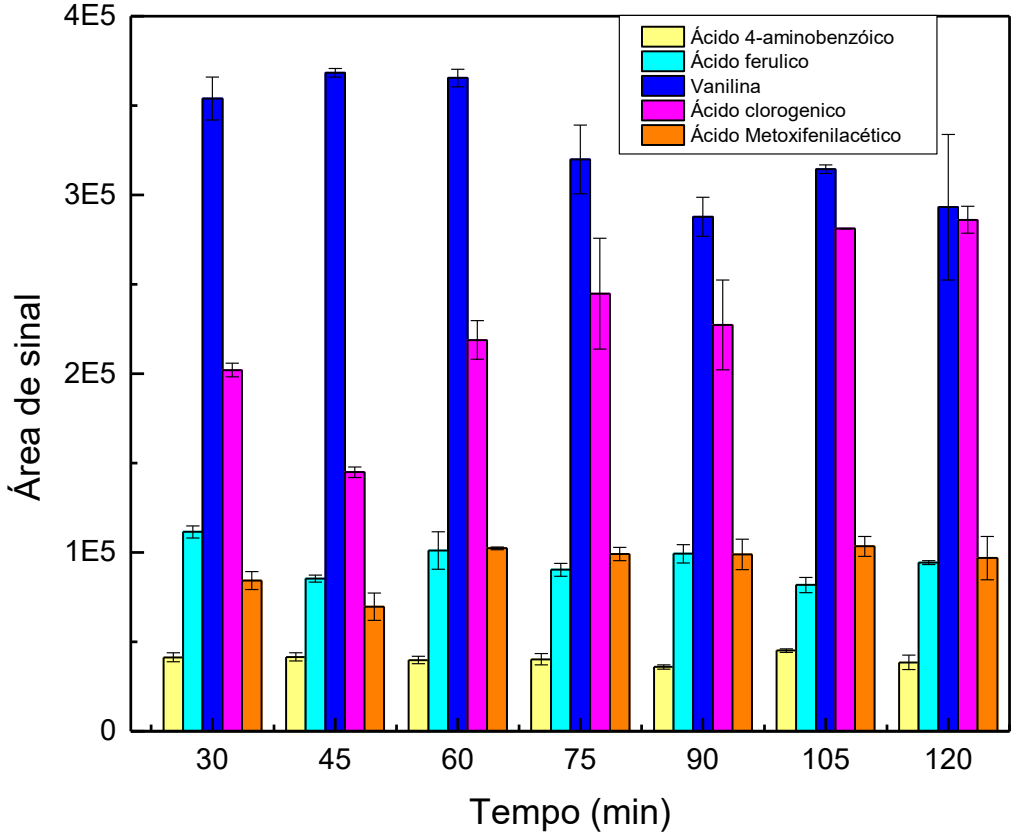
O valor no final de cada barra é associado ao test t de Student, quanto maior esse valor, maior a influência do fator sobre a resposta. Valores positivos indicam que quanto maior o nível de determinado fator, maior será a resposta, assim como valores negativos significam que quanto menor o nível do fator, maior a resposta obtida. O valor p significa a probabilidade de um fator ser estatisticamente significativo, portanto, valores menores que 0,05 indicam que esse fator é estatisticamente significativo.

O gráfico de Pareto para o ácido 4-aminobenzóico mostra que dos parâmetros avaliados, apenas a proporção de extrato: NADES foi significativa. O gráfico mostrou ainda que menores valores de proporção teriam uma resposta analítica mais significativa. Porém, quando foram testados valores menores que aquele avaliados no planejamento, não foi possível separar o NADES do extrato devido a formação de uma pasta. Sendo assim, o valor escolhido para a proporção foi de 1:2 (m/v) de extrato: NADES.

O mesmo tratamento estatístico aplicado aos demais analitos, mostrou um comportamento similar ao do ácido 4-aminobenzóico. Portanto, optou-se por realizar as extrações com a proporção de 1:2 (m/v) de extrato: NADES e a temperatura ambiente para evitar um maior gasto de energia devido a utilização de chapas de aquecimento. Outro motivo, é que os compostos fenólicos podem se degradar em temperaturas elevadas (Li et al., 2014a)

Em relação ao tempo de extração, apesar de não ter sido significativo diversos estudos mostram que quanto maior o tempo mais eficiente é a extração (Ali et al., 2019; Bertolo et al., 2021). A discordância do resultado obtido em relação ao relatado na literatura pode ter ocorrido devido a faixa de tempo selecionada para ser avaliada. Para dirimir essa discrepância, foi realizado um estudo univariado com o tempo de extração variando de 30 a 120 min (n=7). Os resultados obtidos nesse estudo estão apresentados na Figura 11.

Figura 10. Análise univariada do tempo de extração realizada para os cinco compostos fenólicos no extrato de resíduo da indústria de suco de maçã.



De maneira geral, a faixa de tempo avaliada não afetou a extração de ácido 4-aminobenzóico, ácido ferúlico e ácido metoxifenilacético, porém gerou uma leve diminuição para o sinal da vanilina e um leve aumento para ácido clorogênico. Outro destaque foi a grande variação dos resultados para alguns dos tempos avaliados. Sendo assim, tendo como compromisso o conjunto de analitos pode-se indicar que o tempo de 105 min apresentou a melhor resposta e o menor desvio padrão para a maioria dos analitos. Portanto, considerando a análise univariada do tempo e os fatores apresentados anteriormente, os parâmetros escolhidos

para a extração foram de 105 min, realizados na temperatura ambiente (25 °C) e com a menor proporção, sendo ela de 1:2 de extrato: NADES.

A condição experimental otimizada nesse estudo foi adotada também para a extração do β-caroteno com NADES a partir das cascas de cenoura e beterraba.

5.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO DOS MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO

O método analítico utilizado para a determinação dos compostos fenólicos foi adaptado de Schulz et al. (2015) e de β-caroteno adaptado de Szabo et al. (2021). Portanto, foi necessário apenas a avaliação dos parâmetros analíticos de mérito referentes a extração dos compostos. Sendo assim, foram avaliados a linearidade e os limites de detecção e quantificação.

5.4.1 Linearidade

A linearidade constitui na faixa de aplicabilidade do método, onde as respostas são diretamente proporcionais a concentração do analito. Para as curvas de calibração por adição de padrão dos compostos fenólicos, a faixa avaliada foi de 0 a 5 mg L^{-1} com 7 níveis de concentração. Para a curva de calibração por adição de padrão do β-caroteno, foi avaliada a faixa de 0 a 3 mg L^{-1} com 6 níveis de concentração. Os valores da equação de regressão para cada analito, assim com o coeficiente de determinação e os testes estatísticos utilizados obtidos para os analitos estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 9. Parâmetros de mérito para as curvas analíticas dos bioativos

Analito	Equação de regressão	R^2	Coef. de variação (%)	Significância da regressão		Distribuição dos resíduos	
				Teste F	Valor p	Shapiro-wilk	Valor p
β-caroteno (cenoura)	Y= 11,71x + 20,721	0,9843	2,1	250,7	$9,29x10^{-05}$	0,905	0,403
β-caroteno (beterraba)	Y= 63,363x + 1,7602	0,9811	4,4	207,6	$1,35x10^{-4}$	0,868	0,220
Vanilina	Y= 136735x + 96897	0,9591	9,54	93,90	$6,34x10^{-4}$	0,881	0,277
Ácido clorogênico	Y= 147928x + 27095	0,9827	9,9	227,7	$1,12x10^{-4}$	0,942	0,675
Ácido ferúlico	Y= 227265x - 18880	0,9903	11,1	410,2	$3,51x10^{-5}$	0,821	0,090
Ácido 4-aminobenzoico	Y= 7195,6x + 3870,8	0,9881	12,8	414,2	$5,30x10^{-6}$	0,964	0,856
Ácido metoxifenilacetico	Y= 86908x + 19084	0,9991	11,3	5312	$9,21x10^{-9}$	0,967	0,880

Através do coeficiente de determinação foi possível concluir que os valores encontrados de área apresentam uma boa correlação com as concentrações (R^2 maiores que 0,950). Também foi realizado o Teste F (α = 5%) para verificar a linearidade, para isso os valores de F devem ser maiores que o F crítico e os valores p menores que 0,05. Observando os dados da tabela foi possível concluir que o modelo foi estatisticamente significativo.

Para avaliar se os resíduos dos modelos matemáticos apresentavam uma distribuição normal foi usado o Teste de Shapiro-Wilk. Através dos valores obtidos foi possível concluir que eles apresentaram uma distribuição normal, já que em todos os casos o valor p foi maior que 0,05. Este resultado, juntamente com o do Teste F, possibilita concluir que os modelos obtidos são adequados para determinar a concentração dos analitos nas amostras.

5.4.2 Limites de detecção e quantificação

Pela definição da IUPAC, o limite de detecção é o menor valor que pode ser detectado com certa confiança pelo método proposto. Enquanto que o limite de quantificação é o menor valor que pode ser quantificado para o mesmo método. Os valores calculados de LOD e LOQ para todos os analitos estão apresentados na Tabela 11. Para o cálculo foi utilizado o método de razão sinal/ruído.

Tabela 10. Valores obtidos para os limites de detecção e quantificação para os diferentes analitos.

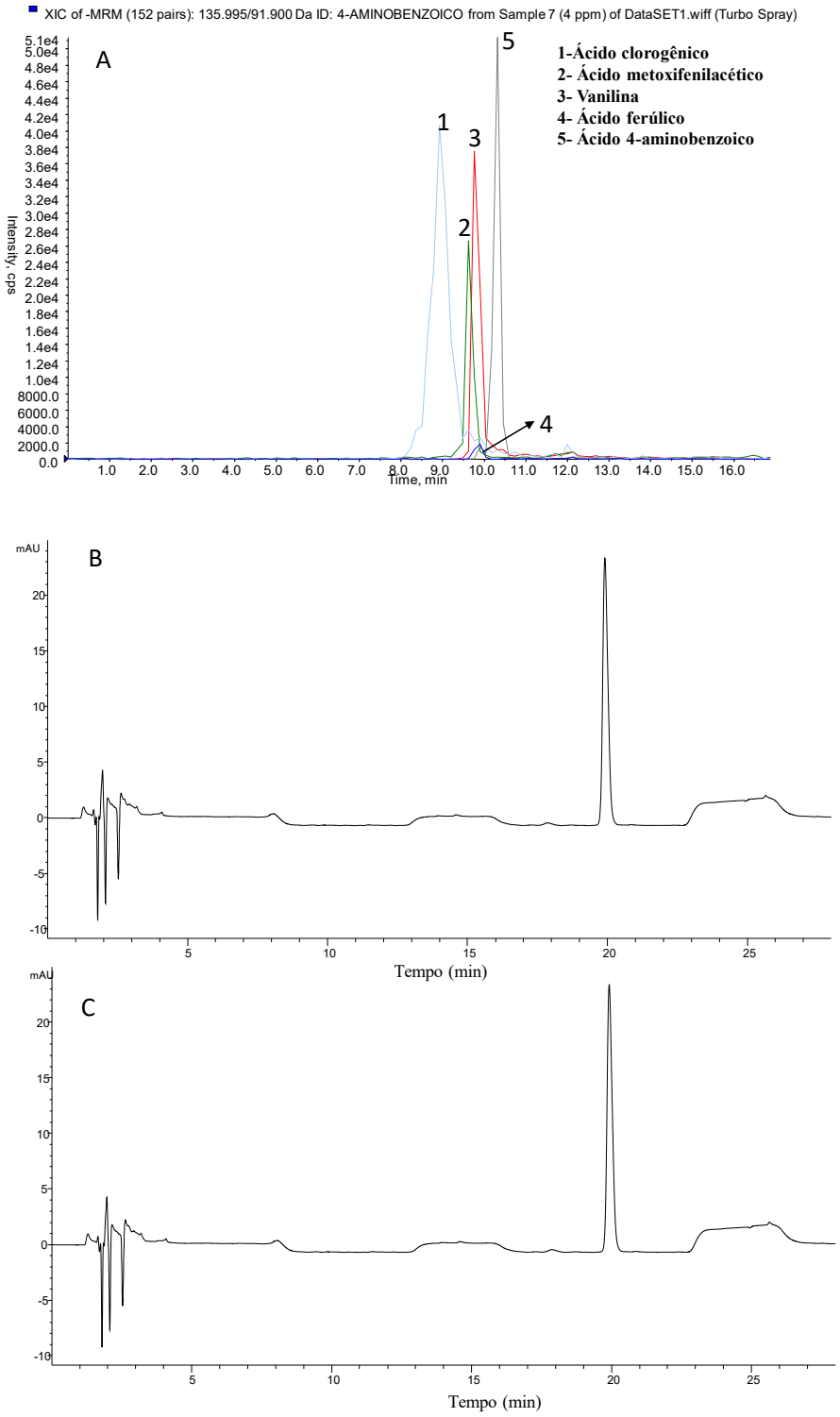
Analito	**LD (mg L^{-1})**	**LQ (mg L^{-1})**
β-caroteno (cenoura)	0,14	0,44
β-caroteno (beterraba)	0,12	0,36
Vanilina	0,03	0,11
Ácido clorogênico	0,07	0,22
Ácido ferúlico	$7,5 \times 10^{-3}$	0,02
Ácido 4-aminobenzóico	0,03	0,10
Ácido metoxifenilacético	0,10	0,32

Analisando os valores obtidos foi possível concluir que os métodos utilizados são adequados para a determinação desses analitos nas amostras de interesse, já que devem ser encontrados em concentração relativamente elevada nessas amostras de extrato.

5.5 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS COMPOSTOS BIOATIVOS NAS AMOSTRAS DOS EXTRATOS OBTIDOS COM NADES

A determinação dos compostos bioativos foi feita em três diferentes tipos de extratos de matrizes diferentes, sendo todas de origem vegetal. Um cromatograma típico da determinação de compostos fenólicos e β-caroteno nos extratos com NADES estão apresentados na Figura 11.

Figura 11. Cromatogramas extraídos dos cinco compostos fenólicos (ácido 4-aminobenzoico, vanilina, ácido clorogênico, ácido ferúlico e o ácido metoxifenilacético) em extrato de resíduo de indústria de suco de maçã em NADES (A), cromatograma do β-caroteno em extrato de cenoura em NADES (B) e cromatograma do β-caroteno em extrato de beterraba em NADES (C).



A partir dos cromatogramas foi possível concluir que não houve a presença de interferentes nas amostras, sendo possível quantificar todos os compostos propostos. Para os compostos fenólicos, os cromatogramas apresentados são referentes a intensidade da transição de massas mais intensa, sendo todos eles retirados da mesma corrida.

O método proposto para o β-caroteno teve como objetivo separar outros carotenoides possivelmente presentes nas amostras, por isso que o tempo de eluição foi elevado. Como perspectiva do método usado, poderia ser realizada uma otimização nas condições de separação para que a eluição ocorresse em menor tempo. As concentrações dos analitos nos extratos estudados estão apresentadas na Tabela 12.

Tabela 11. Concentrações calculadas através do método de adição de padrão para os extratos de cenoura, beterra e maçã.

Analito	**Concentração (μg g^{-1})**
β-caroteno (cenoura)	790 ± 70
β-caroteno (beterraba)	0,44 ± 0,12
Vanilina	8,50 ± 3,8 x
Ácido clorogênico	2,20 ± 5,25
Ácido ferulico	0,99 ± 5,91
Ácido 4-aminobenzoico	6,45 ± 3,63
Ácido metoxifenilacético	2,63 ± 1,55

Ao analisar os resultados obtidos para os fenólicos foi possível concluir que eles estão dentro da faixa limite definida para essa análise (>LOQ). Os resultados mostram que a vanilina foi o composto extraído em maior concentração e o ácido ferúlico o menor. Essa diferença pode ser resultante da quantidade de cada composto fenólico estudado disponível no resíduo da indústria de suco de maçã. Outra possível explicação estaria relacionada ao processo de extração, mais especificamente características dos compostos fenólicos extraídos como valores de Log p e pKa. A vanilina apresenta um alto valor de Log p (1,37 – Tabela 2), juntamente com ácido ferúlico e ácido metoxifenilacético, indicando ser relativamente apolar, o que facilitaria sua extração no NADES apolar. Além disso, a vanilina apresenta o maior valor de pKa1 (7,4 – Tabela 2) dos compostos, indicando que possivelmente esteja na forma neutra durante a extração o que também pode auxiliar na sua extração para o NADES. Sendo assim, as

concentrações dos compostos fenólicos no extrato avaliado estão atreladas a um conjunto de fatores.

Foi possível comparar o resultado com a extração em outras matrizes, como a de um estudo em relação a folha da nogueira (X. Fu et al., 2022). Os valores de concentrações encontrados na folha foram parecidos com os obtidos neste trabalho, mesmo sendo outra matriz. Vale ressaltar que foi procurado em diversas bases para artigos, e são poucos trabalhos que utilizam desse NADES para a extração de compostos fenólicos, por isso que a comparação foi feita com outras matrizes e outros DES.

Em relação ao β-caroteno, como já era esperado, a concentração dele na cenoura é maior que no extrato da beterraba. Ao comparar com a literatura, os valores encontrados se apresentaram maior em relação a outras matrizes, como suco de melancia, uva e tomate (Pochivalov et al., 2023).

Esses resultados indicam que o solvente utilizado e a técnica de extração proposta se mostraram eficiente para a extração dos compostos fenólicos e do β-caroteno. Também, por ser um solvente que usa compostos naturais, ele se torna mais vantajoso quando comparado com solventes orgânicos convencionais, por ser uma extração mais verde.

Outros testes poderiam ser feitos para melhorar a eficiência de extração, como por exemplo a utilização de técnicas para diminuir o tempo de extração, como o uso de ultrassom ou ultra-turrax. Também é possível avaliar outros tipos de NADES para poder extrair outros compostos com interesse comercial.

6 CONCLUSÃO

A utilização do mentol e do ácido caprílico para a formação de um NADES apresentou resultados satisfatórios, pois através das caracterizações propostas foi possível concluir que houve a formação do solvente. As técnicas de RMN, IV, TGA, DSC, viscosidade, densidade e índice de refração mostraram-se dentro do esperado quando comparado com a literatura e com isso foi possível aplicar o NADES para a produção de extratos. Também foi realizado um ensaio microbiológico que mostrou uma baixa toxicidade para o solvente proposto, sendo uma boa alternativa na substituição dos solventes orgânicos convencionais.

Através do planejamento de experimentos foi possível otimizar as melhores condições para a extração. Mesmo sendo um tempo longo, o gasto de energia foi reduzido, pois não foi necessário o uso de uma chapa de aquecimento, nem de outros equipamentos. Como perspectiva

futura, poderia ser realizado um estudo com técnicas como ultra-turrax, ultrassom para diminuir esse tempo de extração e ter uma melhor eficiência.

Com o método proposto foi possível extrair cinco compostos fenólicos de resíduos da produção industrial de suco de maçã e o β-caroteno de duas matrizes diferentes, a casca da cenoura e da beterraba. Portanto, foi possível reutilizar rejeitos orgânicos para extrair bioativos que possuem sua aplicação industrial, seja cosmética ou até na prevenção de doenças, utilizando um solvente mais verde do que os métodos convencias.

7 REFERÊNCIAS

Abbott, A. P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D. L., & Rasheed, R. K. (2004). Deep Eutectic Solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: Versatile alternatives to ionic liquids. *Journal of the American Chemical Society*, *126*(29), 9142–9147. https://doi.org/10.1021/ja048266j

Ali, M. C., Chen, J., Zhang, H., Li, Z., Zhao, L., & Qiu, H. (2019). Effective extraction of flavonoids from Lycium barbarum L. fruits by deep eutectic solvents-based ultrasound-assisted extraction. *Talanta*, *203*, 16–22. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.012

Alonso-Esteban, J. I., González-Fernández, M. J., Fabrikov, D., de Cortes Sánchez-Mata, M., Torija-Isasa, E., & Guil-Guerrero, J. L. (2023). Fatty acids and minor functional compounds of hemp (Cannabis sativa L.) seeds and other Cannabaceae species. *Journal of Food Composition and Analysis*, *115*. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104962

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, *117*(4), 426–436. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014

Badawy, M. E. I., El-Nouby, M. A. M., Kimani, P. K., Lim, L. W., & Rabea, E. I. (2022). A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis. In *Analytical Sciences*. Springer. https://doi.org/10.1007/s44211-022-00190-8

Bandeira, D. M., Correa, J. M., Laskoski, L. V., Batista, J. M., Rosset, J., da Costa, W. F., Kuo, L. H., & Pinto, F. G. da S. (2022). Extraction, characterization of bioactive compounds and biological activities of the leaves of Podocarpus lambertii Klotzch ex Endl. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 100427. https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2022.100427

Battino, M., Belwal, T., & Prieto, M. A. (2023). Valorization of food products using natural functional compounds for improving organoleptic and functional chemistry. *Food Chemistry*, *403*, 134181. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134181

Bertolo, M. R. V., Martins, V. C. A., Plepis, A. M. G., & Bogusz, S. (2021). Utilization of pomegranate peel waste: Natural deep eutectic solvents as a green strategy to recover valuable phenolic compounds. *Journal of Cleaner Production*, *327*. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.129471

Bi, W., Tian, M., & Row, K. H. (2013). Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. *Journal of Chromatography A*, *1285*, 22–30. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.041

Cao, J., Yang, M., Cao, F., Wang, J., & Su, E. (2017). Well-Designed Hydrophobic Deep Eutectic Solvents As Green and Efficient Media for the Extraction of Artemisinin from Artemisia annua Leaves. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, *5*(4), 3270–3278. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b03092

Castro, T. A., Leite, B. S., Assunção, L. S., de Jesus Freitas, T., Colauto, N. B., Linde, G. A., Otero, D. M., Machado, B. A. S., & Ferreira Ribeiro, C. D. (2021). Red tomato products as an alternative to reduce synthetic dyes in the food industry: A review. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 23). MDPI. https://doi.org/10.3390/molecules26237125

Choi, Y. H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I. W. C. E., Witkamp, G. J., & Verpoorte, R. (2011). Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiology*, *156*(4), 1701–1705. https://doi.org/10.1104/pp.111.178426

Cunha, S. C., & Fernandes, J. O. (2018). Extraction techniques with deep eutectic solvents. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *105*, 225–239. https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.05.001

Dadwal, V., Joshi, R., & Gupta, M. (2023). Comparative metabolomics of Himalayan crab apple (Malus baccata) with commercially utilized apple (Malus domestica) using UHPLC-QTOF-IMS coupled with multivariate analysis. *Food Chemistry*, *402*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134529

de Cock, A., Forio, M. A. E., de Meulenaer, B., Tack, F., Dominguez-Granda, L., & Goethals, P. L. M. (2023). The nutritional quality of the red mangrove crab (Ucides occidentalis), harvested at two reserves in the Guayas estuary. *Food Chemistry*, *401*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134105

de Sales, D. L., Motta, A. C., Marcomini, A. L., Beatrice, C. A. G., Franco, P. H. D. R., Dantas, F. M. L., & da Rocha-Leão, M. H. M. (2018). UMA BREVE ABORDAGEM SOBRE AS DISPERSÕES SÓLIDAS. *Semioses*, *12*(3), 72–92. https://doi.org/10.15202/1981996x.2018v12n3p72

Deng, W., Yu, L., Li, X., Chen, J., Wang, X., Deng, Z., & Xiao, Y. (2019). Hexafluoroisopropanol-based hydrophobic deep eutectic solvents for dispersive liquid-

liquid microextraction of pyrethroids in tea beverages and fruit juices. *Food Chemistry*, *274*, 891–899. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.048

English, A., & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2019). *The state of food and agriculture. 2019, Moving forward on food loss and waste reduction* (p. 156).

Fan, T., Yan, Z., Yang, C., Qiu, S., Peng, X., Zhang, J., Hu, L., & Chen, L. (2021). Preparation of menthol-based hydrophobic deep eutectic solvents for the extraction of triphenylmethane dyes: Quantitative properties and extraction mechanism. *Analyst*, *146*(6), 1996–2008. https://doi.org/10.1039/d0an01864c

Florindo, C., Monteiro, N. v., Ribeiro, B. D., Branco, L. C., & Marrucho, I. M. (2020). Hydrophobic deep eutectic solvents for purification of water contaminated with Bisphenol-A. *Journal of Molecular Liquids*, *297*. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111841

Food and Agriculture Organization of the United Nations., & Food Wastage Footprint (Project). (2013). *Food wastage footprint : impacts on natural resources : summary report.* FAO.

Fu, N., Lv, R., Guo, Z., Guo, Y., You, X., Tang, B., Han, D., Yan, H., & Row, K. H. (2017). Environmentally friendly and non-polluting solvent pretreatment of palm samples for polyphenol analysis using choline chloride deep eutectic solvents. *Journal of Chromatography A*, *1492*, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.02.036

Fu, X., Belwal, T., He, Y., Xu, Y., Li, L., & Luo, Z. (2022). UPLC-Triple-TOF/MS characterization of phenolic constituents and the influence of natural deep eutectic solvents on extraction of Carya cathayensis Sarg. peels: Composition, extraction mechanism and in vitro biological activities. *Food Chemistry*, *370*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131042

Guler, A. (2023). Effects of different maceration techniques on the colour, polyphenols and antioxidant capacity of grape juice. *Food Chemistry*, *404*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134603

Huang, Y., Feng, F., Jiang, J., Qiao, Y., Wu, T., Voglmeir, J., & Chen, Z. G. (2017). Green and efficient extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, *221*, 1400–1405. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.013

Jayesree, N., Hang, P. K., Priyangaa, A., Krishnamurthy, N. P., Ramanan, R. N., Turki, M. S. A., Charis, M. G., & Ooi, C. W. (2021). Valorisation of carrot peel waste by water-induced

hydrocolloidal complexation for extraction of carote and pectin. *Chemosphere*, *272*. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129919

Jeswani, H. K., Figueroa-Torres, G., & Azapagic, A. (2021). The extent of food waste generation in the UK and its environmental impacts. *Sustainable Production and Consumption*, *26*, 532–547. https://doi.org/10.1016/j.spc.2020.12.021

Ji, Y., Meng, Z., Zhao, J., Zhao, H., & Zhao, L. (2020). Eco-friendly ultrasonic assisted liquid–liquid microextraction method based on hydrophobic deep eutectic solvent for the determination of sulfonamides in fruit juices. *Journal of Chromatography A*, *1609*. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460520

Kannouma, R. E., Hammad, M. A., Kamal, A. H., & Mansour, F. R. (2022). Miniaturization of Liquid-Liquid extraction; the barriers and the enablers. In *Microchemical Journal* (Vol. 182). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107863

Kumar, V., Sharma, N., Umesh, M., Selvaraj, M., Al-Shehri, B. M., Chakraborty, P., Duhan, L., Sharma, S., Pasrija, R., Awasthi, M. K., Lakkaboyana, S. R., Andler, R., Bhatnagar, A., & Maitra, S. S. (2022). Emerging challenges for the agro-industrial food waste utilization: A review on food waste biorefinery. In *Bioresource Technology* (Vol. 362). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127790

Li, A. N., Li, S., Zhang, Y. J., Xu, X. R., Chen, Y. M., & Li, H. bin. (2014a). Resources and biological activities of natural polyphenols. In *Nutrients* (Vol. 6, Issue 12, pp. 6020–6047). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/nu6126020

Li, A. N., Li, S., Zhang, Y. J., Xu, X. R., Chen, Y. M., & Li, H. bin. (2014b). Resources and biological activities of natural polyphenols. In *Nutrients* (Vol. 6, Issue 12, pp. 6020–6047). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/nu6126020

Londoño-Giraldo, L. M., Bueno, M., Corpas-Iguarán, E., Taborda-Ocampo, G., & Cifuentes, A. (2021). Hplc-dad-apci-ms as a tool for carotenoid assessment of wild and cultivated cherry tomatoes. *Horticulturae*, *7*(9). https://doi.org/10.3390/horticulturae7090272

Longo, L. S., & Craveiro, M. v. (2018). Deep eutectic solvents as unconventional media for multicomponent reactions. In *Journal of the Brazilian Chemical Society* (Vol. 29, Issue 10, pp. 1999–2025). Sociedade Brasileira de Quimica. https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180147

Ma, C., Laaksonen, A., Liu, C., Lu, X., & Ji, X. (2018). The peculiar effect of water on ionic liquids and deep eutectic solvents. *Chemical Society Reviews*, *47*(23), 8685–8720. https://doi.org/10.1039/c8cs00325d

Majidi, S. M., & Hadjmohammadi, M. R. (2019). Alcohol-based deep eutectic solvent as a carrier of SiO2@Fe3O4 for the development of magnetic dispersive micro-solid-phase extraction method: Application for the preconcentration and determination of morin in apple and grape juices, diluted and acidic extract of dried onion and green tea infusion samples. *Journal of Separation Science*, *42*(17), 2842–2850. https://doi.org/10.1002/jssc.201900234

Makoś, P., Słupek, E., & Gębicki, J. (2020a). Hydrophobic deep eutectic solvents in microextraction techniques–A review. *Microchemical Journal*, *152*(October 2019), 104384. https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104384

Makoś, P., Słupek, E., & Gębicki, J. (2020b). Hydrophobic deep eutectic solvents in microextraction techniques–A review. In *Microchemical Journal* (Vol. 152). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104384

Mirheli, M., & Taghian Dinani, S. (2018). Extraction of β-carotene pigment from carrot processing waste using ultrasonic-shaking incubation method. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *12*(3), 1818–1828. https://doi.org/10.1007/s11694-018-9796-2

Nunes, R. J., Saramago, B., & Marrucho, I. M. (2019). Surface Tension of dl -Menthol:Octanoic Acid Eutectic Mixtures. *Journal of Chemical and Engineering Data*, *64*(11), 4915–4923. https://doi.org/10.1021/acs.jced.9b00424

Ortega-Zamora, C., González-Sálamo, J., González-Sálamo, J., Hernández-Sánchez, C., Hernández-Sánchez, C., Hernández-Borges, J., & Hernández-Borges, J. (2020). Menthol-Based Deep Eutectic Solvent Dispersive Liquid-Liquid Microextraction: A Simple and Quick Approach for the Analysis of Phthalic Acid Esters from Water and Beverage Samples. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, *8*(23), 8783–8794. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c02603

Panić, M., Radić Stojković, M., Kraljić, K., Škevin, D., Radojčić Redovniković, I., Gaurina Srček, V., & Radošević, K. (2019). Ready-to-use green polyphenolic extracts from food by-products. *Food Chemistry*, *283*, 628–636. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.061

Patocka, J., Bhardwaj, K., Klimova, B., Nepovimova, E., Wu, Q., Landi, M., Kuca, K., Valis, M., & Wu, W. (2020). Malus domestica: A review on nutritional features, chemical composition, traditional and medicinal value. In *Plants* (Vol. 9, Issue 11, pp. 1–19). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/plants9111408

Pochivalov, A., Cherkashina, K., Sudarkin, A., Osmolowsky, M., Osmolovskaya, O., Krekhova, F., Nugbienyo, L., & Bulatov, A. (2023). Liquid-liquid microextraction with hydrophobic deep eutectic solvent followed by magnetic phase separation for preconcentration of antibiotics. *Talanta*, *252*. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123868

Qu, Q., Lv, Y., Liu, L., Row, K. H., & Zhu, T. (2019). Synthesis and characterization of deep eutectic solvents (five hydrophilic and three hydrophobic), and hydrophobic application for microextraction of environmental water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *411*(28), 7489–7498. https://doi.org/10.1007/s00216-019-02143-z

Rahrovani, F., Javanbakht, M. H., Ehsani, A. H., Esrafili, A., Mohammadi, H., Ghaedi, E., Zarei, M., & Djalali, M. (2018). Erythrocyte membrane saturated fatty acids profile in newly diagnosed Basal Cell Carcinoma patients. *Clinical Nutrition ESPEN*, *23*, 107–111. https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2017.11.007

Rakha, A., Umar, N., Rabail, R., Butt, M. S., Kieliszek, M., Hassoun, A., & Aadil, R. M. (2022). Anti-inflammatory and anti-allergic potential of dietary flavonoids: A review. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 156). Elsevier Masson s.r.l. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113945

Sas, O. G., Castro, M., Domínguez, Á., & González, B. (2019). Removing phenolic pollutants using Deep Eutectic Solvents. *Separation and Purification Technology*, *227*. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.115703

Schulz, M., Borges, G. da S. C., Gonzaga, L. V., Seraglio, S. K. T., Olivo, I. S., Azevedo, M. S., Nehring, P., de Gois, J. S., de Almeida, T. S., Vitali, L., Spudeit, D. A., Micke, G. A., Borges, D. L. G., & Fett, R. (2015). Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (Euterpe edulis Martius) during ripening. *Food Research International*, *77*, 125–131. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.006

Shishov, A., Volodina, N., Nechaeva, D., Gagarinova, S., & Bulatov, A. (2019). An automated homogeneous liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for the HPLC-UV determination of caffeine in beverages. *Microchemical Journal*, *144*, 469–473. https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.10.014

Soleimani, M., Arzani, A., Arzani, V., & Roberts, T. H. (2022). Phenolic compounds and antimicrobial properties of mint and thyme. *Journal of Herbal Medicine*, 100604. https://doi.org/10.1016/j.hermed.2022.100604

Szabo, K., Emőke Teleky, B., Ranga, F., Simon, E., Lelia Pop, O., Babalau-Fuss, V., Kapsalis, N., & Cristian Vodnar, D. (2021). Bioaccessibility of microencapsulated carotenoids, recovered from tomato processing industrial by-products, using in vitro digestion model. *LWT*, *152*. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112285

Vogel, R. M., Ross, M. L. R., Swann, C., Rothwell, J. E., & Stevens, C. J. (2022). Athlete perceptions of flavored, menthol-enhanced energy gels ingested prior to endurance exercise in the heat. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, *19*(1), 580–592. https://doi.org/10.1080/15502783.2022.2117995

Wiley, J., Silverstein, R. M., Webster, F. X., & Kiemle, D. J. (2005). *SPECTROMETRIC IDENTIFICATION OF ORGANIC COMPOUNDS*.

Yamini, Y., Rezazadeh, M., & Seidi, S. (2019). Liquid-phase microextraction – The different principles and configurations. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *112*, 264–272. https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.010

Yao, Y., Goh, H. M., & Kim, J. E. (2021). The roles of carotenoid consumption and bioavailability in cardiovascular health. In *Antioxidants* (Vol. 10, Issue 12). MDPI. https://doi.org/10.3390/antiox10121978

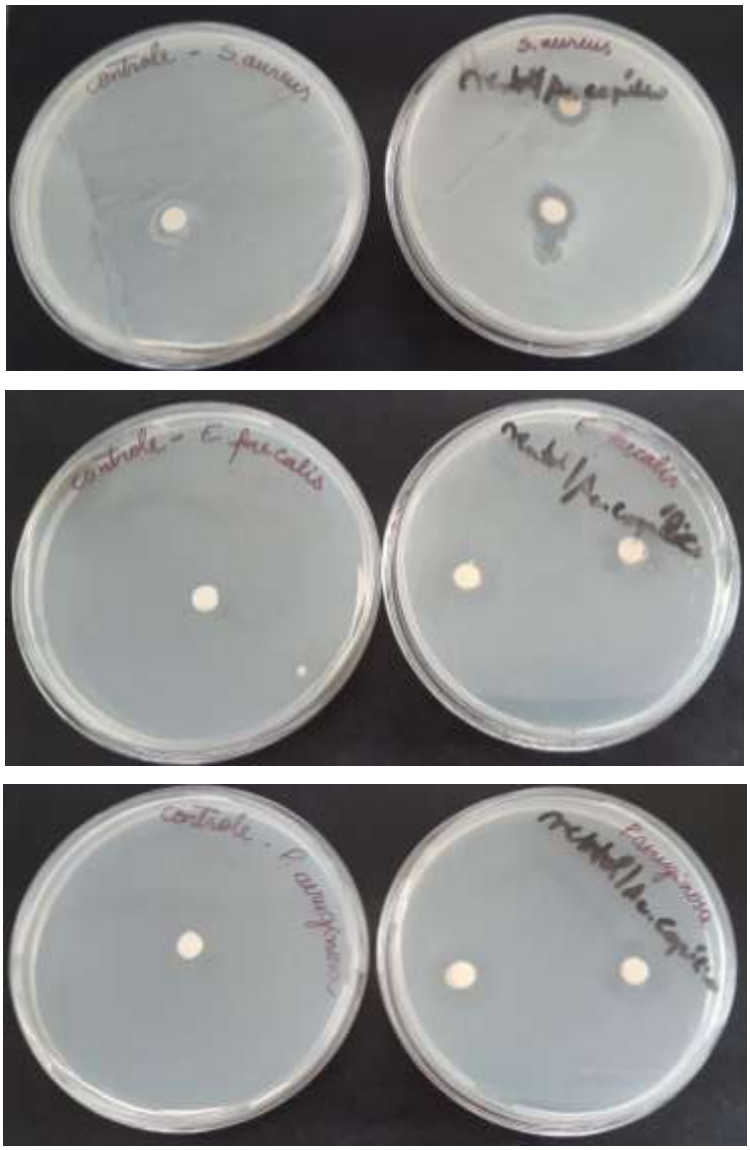
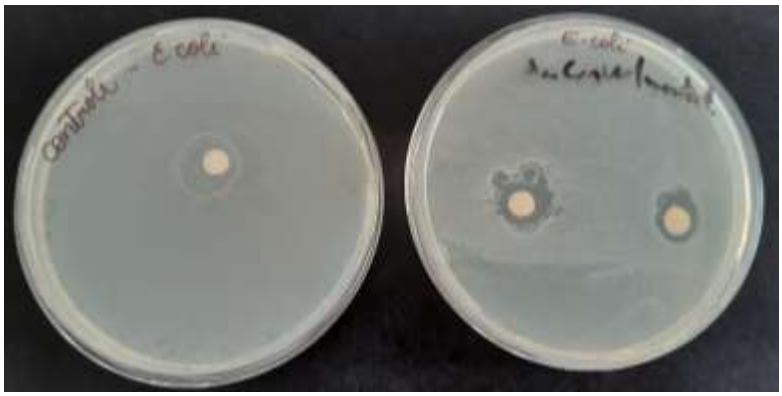
Zhao, B. Y., Xu, P., Yang, F. X., Wu, H., Zong, M. H., & Lou, W. Y. (2015). Biocompatible Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride: Characterization and Application to the Extraction of Rutin from Sophora japonica. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, *3*(11), 2746–2755. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00619

APÊNDICE A - Paramêtros do espectômetro de massas para os cinco compostos fenólicos avaliados.

Composto	**$[M - H]^-$/Íon quantitativo (m/z)**	**DP***	**EP***	**CEP***	**CE***	**CXP***
Ácido 4-aminobenzoico	135.8/90.5	-20.00	-9.50	-10.00	-16.00	-2.00
Ácido clorogenico	352.8/187.8	-25.00	-5.00	-24.00	-28.00	-2.00
Ácido ferulico	192.8/129.7	-40.00	-7.00	-10.00	-24.00	-2.00
Vanilina	150.8/132.8	-25.00	-3.00	-14.00	-14.00	-2.00
Ácido metoxifenilacético	164.9/118.7	-10.00	-10.00	-10.00	-6.00	-2.00

* DP- Declustering Potential; EP- Entrance Potential; CEP- Collision Cell Entrance Potential; CE- Collision Energy; CXP- Collision Cell Exit Potential.

APÊNDICE B - Ensaio microbiológico realizado com quatro bactérias (s. aureus, e. faecalis, e. coli e p. aeuruginosa). A esquerda o grupo controle e na direita o ensaio realizado para o nades.



APÊNDICE B/ *continuação*