



## **Novos métodos de extração de compostos bioativos de verduras**

**Juliana da Conceição Correia Dias**

**Escola Superior de Tecnologia e Gestão  
Instituto Politécnico de Bragança**

para obtenção do grau de Mestre em  
**Tecnologia Biomédica**

julho de 2015





## **Novos métodos de extração de compostos bioativos de verduras**

**Juliana da Conceição Correia Dias**

**Escola Superior de Tecnologia e Gestão  
Instituto Politécnico de Bragança**

para obtenção do grau de Mestre em  
**Tecnologia Biomédica**

Supervisores:

**Olga Ferreira**

**Isabel C.F.R. Ferreira**

**Lillian Barros**

julho de 2015



*“Paciência e perseverança têm o efeito mágico  
De fazer as dificuldades desaparecerem e os obstáculos sumirem.”*

*John Quincy Adams*



## **Agradecimentos**

A concretização deste sonho só foi possível porque a meu lado tive pessoas fantásticas que me deram força ao longo de todo o percurso. É a estas pessoas que faz todo o sentido agradecer, pois foram, sem dúvida, os meus ‘alicerces’.

Um agradecimento especial à Professora Olga, à Professora Isabel e à Doutora Lillian, pelos conhecimentos que me deram, pelo esclarecimento de dúvidas que elevaram os meus conhecimentos científicos e sem dúvida estimularam o meu desejo de querer saber mais e vontade de fazer melhor, pelo profissionalismo que tiveram em todos os momentos ao longo desta etapa, que com toda a dedicação me foi dada.

Aos meus pais e irmã, que sempre lutaram e se esforçaram para me proporcionar a melhor educação, me deram asas para sonhar e concretizar, transmitindo todo o apoio, carinho e nunca me deixaram desistir. Aturaram os meus dias menos bons, aqueles dias em que o cansaço é maior que a vontade, e que os nervos estão à flor da pele. Obrigada por se orgulharem tanto deste meu percurso realizado.

Ao Zé, pelo amor, carinho, pela força e motivação, por ser namorado, amigo, companheiro, por me ter dado força quando já não a tinha, pela ajuda ao longo de todo o meu percurso e ter acreditado em mim.

À minha família e amigos que sempre estiveram presentes em todos os momentos, compartilhando comigo os meus sucessos.

Agradeço o apoio do Professor João Coutinho da Universidade de Aveiro para a realização deste trabalho. Por fim, agradeço à Dra. Paula Plasencia, do Laboratório de Química Analítica da ESTiG, o apoio prestado na realização das análises por Karl-Fischer.

A todos, que de forma direta ou indireta me ajudaram a concretizar este Sonho.

A todos, o meu Muito Obrigada!



## Resumo

A extração de compostos fenólicos é, tradicionalmente, realizada utilizando solventes orgânicos voláteis que apresentam diversas desvantagens entre as quais toxicidade, volatilidade e inflamabilidade. Neste trabalho pretende-se estudar a utilização de solventes alternativos que possam colmatar algumas das desvantagens descritas, mantendo ou superando o desempenho dos solventes convencionais. Assim, numa primeira fase foram estudadas soluções aquosas de quatro compostos iónicos (cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio, cloreto de tetrametilamónio, cloreto de cetilpiridínio, brometo de miristiltrimetilamónio) e, posteriormente, dois surfactantes não iónicos (Triton X-100 e Genapol X-080) e um surfactante aniónico (dodecil sulfato de sódio). Além do tipo de solvente, avaliou-se ainda o efeito da concentração e do tempo de contacto na eficiência da extração.

Como planta modelo, escolheu-se a espécie *Asparagus acutifolius* L., uma planta comestível, fonte de compostos bioativos, mas apresentando um perfil fenólico simples dominado por apenas 3 compostos.

Os resultados obtidos indicaram que, à temperatura ambiente, o solvente ótimo foi uma solução aquosa de cloreto de cetilpiridínio (CPyrCl), com concentração 0,1 M, durante 1 hora de tempo de extração que, comparando com o solvente convencional (metanol: água, 80:20%, v/v), resulta numa eficiência significativamente maior na extração dos compostos fenólicos encontrados em *A. acutifolius*. Verificou-se, no entanto, que nas condições de máxima eficiência de extração, o extrato de CPyrCl revelou menor atividade antioxidante comparativamente com o resultado da extração hidrometanólica, provavelmente devido a interferências da utilização deste tipo de solventes nos métodos *in vitro* utilizados na avaliação da capacidade antioxidante, aspeto que necessita de elucidação em estudos posteriores.

**Palavras-chave:** Compostos fenólicos, líquidos iónicos, surfactantes.



## **Abstract**

The extraction of phenolic compounds is traditionally carried out using volatile organic solvents which have several disadvantages including toxicity, volatility and flammability. In this work it is intended to study the use of alternative solvents that can overcome some of the disadvantages described, maintaining or exceeding the performance of conventional solvents. Thus, in a first stage, aqueous solutions of four ionic compounds (1-butyl-3-methylimidazolium chloride, tetramethylammonium chloride, cetylpyridinium chloride, myristyltrimethylammonium bromide) were studied and, subsequently, two non-ionic surfactants (Triton X-100 and Genapol X-080) and an anionic surfactant (sodium dodecyl sulfate) were also considered. In addition to the type of solvent, the effect of concentration and contact time on the extraction efficiency was also assessed.

The edible species *Asparagus acutifolius* L., a source of bioactive compounds, with a simple phenolic profile with only 3 compounds, was chosen as plant model.

The results showed that at room temperature, the optimum solvent was an aqueous solution of cetylpyridinium chloride (CPyrCl) with concentration 0.1 M, and extraction time of 1 hour that, when compared to the conventional method (methanol/water 80:20%, v/v), presents a significantly higher efficiency for the extraction of the phenolic compounds present in *A. acutifolius*. It was found, however, that in conditions of maximum efficiency of extraction, the CPyrCl extract showed lower antioxidant activity compared to the result of hydromethanolic extraction, probably due to interferences from the use of such solvents in the *in vitro* methods used to evaluate the antioxidant capacity, aspect which requires further elucidation studies.

**Keywords:** Phenolic compounds, ionic liquids, surfactants.



## **Lista de abreviaturas**

CMC	Concentração micelar crítica
CPyrCl	Cloreto de cetilpiridínio
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamónio
C <sub>4</sub> mimCl	Cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio
DAD	Detetor de arranjo de díodos
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
EAM	Extração assistida por micro-ondas
EAU	Extração assistida por ultrassons
EC <sub>50</sub>	Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor
ELP	Extração líquida pressurizada
ESL	Extração sólido-líquido
LI	Líquido iónico
MDA	Malondialdeído
MeOH	Metanol
MTABr	Brometo de miristiltrimetilamónio
N <sub>1111</sub> Cl	Cloreto de tetrametilamónio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
S/L	Razão sólido-líquido

### *Lista de abreviaturas*

---

$T$	Temperatura
$t$	Tempo de extração
$T_f$	Temperatura de fusão
$\lambda_{max}$	Comprimento de onda máximo
$v/v$	Relação volume/volume
$w/v$	Relação massa/volume
$w/w$	Relação massa/massa

## **Lista de tabelas**

Tabela 1.1: Extração de flavonoides utilizando soluções aquosas de LI e diferentes condições de extração. ....	8
Tabela 1.2: Extração de flavonoides utilizando soluções aquosas de surfactantes e diferentes técnicas de extração. ....	10
Tabela 2.1: Origem e pureza dos solventes utilizados neste trabalho. ....	15
Tabela 2.2: Temperatura de fusão ( $T_f$ ) e concentração micelar crítica (CMC) dos solventes utilizados neste trabalho. ....	16
Tabela 2.3: Teor de água para os diferentes LI. ....	18
Tabela 3.1: Quantificação de compostos fenólicos, usando métodos convencionais de extração. ....	25
Tabela 3.2: Quantificação de compostos fenólicos extraídos, após 1 hora, utilizando líquidos iônicos com concentração 1,50 M. ....	26
Tabela 3.3: Quantificação de compostos fenólicos extraídos após 1 hora, utilizando surfactantes. ....	28
Tabela 3.4: Quantificação de compostos fenólicos extraídos após 1 hora, em função da concentração do solvente. ....	30
Tabela 3.5: Quantificação de compostos fenólicos após diferentes tempos de extração. ....	31
Tabela 3.6: Características analíticas de padrões fenólicos utilizados no método de análise. ....	32
Tabela 3.7: Resultados obtidos da atividade antioxidante para o CPyrCl (0,1 M) e MeOH:H <sub>2</sub> O. ....	33



## Lista de figuras

Figura 1.1: Estruturas químicas dos três compostos fenólicos estudados. ....	2
Figura 1.2: Cátions e aniões comuns em líquidos iônicos, adaptado de Joshi e Anderson (2012). ....	3
Figura 1.3: Representação de uma micela, adaptado de Rinaldi <i>et al.</i> (2007). ....	4
Figura 2.1: Equipamento de titulação de Karl-Fischer. ....	18
Figura 2.2: Representação esquemática do processo de extração: A. Mistura inicial de planta + solvente; B. Processo de extração com agitação magnética; C. Amostras de soluções do extrato para análise por HPLC. ....	19
Figura 2.3: Equipamento HPLC-DAD. ....	20
Figura 3.1: Perfil de compostos fenólicos de extrato de <i>Asparagus acutifolius</i> , utilizando metanol: água (80:20%, v/v), registado a 370 nm. 1- Quercetina 3- <i>O</i> -rutinósido; 2- Canferol 3- <i>O</i> -rutinósido; 3-Isoramnetina 3- <i>O</i> -rutinósido. ....	24
Figura 3.2: Efeito dos líquidos iônicos sobre a eficiência de extração de compostos fenólicos. ....	27
Figura 3.3: Efeito dos surfactantes sobre a eficiência de extração de compostos fenólicos. ....	29
Figura 3.4: Efeito da concentração de solvente sobre a eficiência de extração de compostos fenólicos. ....	30
Figura 3.5: Efeito do tempo sobre a eficiência de extração de compostos fenólicos. ....	31
Figura A.1: Reta de calibração da quercetina 3- <i>O</i> -rutinósido em CPyrCl (0.1M). ....	41
Figura A.2: Reta de calibração da quercetina 3- <i>O</i> -rutinósido em MeOH:H <sub>2</sub> O. ....	41
Figura A.3: Reta de calibração de canferol 3- <i>O</i> -rutinósido em CPyrCl (0.1M). ....	42
Figura A.4: Reta de calibração de canferol 3- <i>O</i> -rutinósido em MeOH:H <sub>2</sub> O. ....	42

*Lista de figuras*

---

Figura A.5: A e B correspondem às amostras de diferentes concentrações de quercetina 3-*O*-rutinósido em MeOH:H<sub>2</sub>O e CPyrCl (0,1 M), respetivamente. B C e D correspondem às amostras de canferol 3-*O*-rutinósido em em MeOH:H<sub>2</sub>O e CPyrCl (0,1 M), respetivamente. .... 43

# Conteúdo

Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	v
Abstract.....	vii
Lista de abreviaturas .....	ix
Lista de tabelas .....	xi
Lista de figuras .....	xiii
Conteúdo.....	xv
Capítulo 1. Introdução.....	1
1.1. Enquadramento e objetivos deste trabalho .....	1
1.2. Estrutura da dissertação .....	2
1.3. Extração de produtos naturais.....	3
1.3.1 Solventes não convencionais.....	3
1.3.2 Exemplos de aplicação .....	5
1.4. Atividade antioxidante .....	11
1.4.1 Atividade captadora de radicais DPPH .....	11
1.4.2 Poder Redutor.....	12
1.4.3 Inibição da descoloração do $\beta$ -caroteno .....	12
Capítulo 2. Materiais e Métodos .....	15
2.1. Materiais .....	15
2.1.1 Ensaios de extração .....	15

## Conteúdo

---

2.1.2	Ensaio de análise química.....	16
2.1.3	Ensaio de avaliação da atividade antioxidante .....	17
2.1.4	Amostras de planta .....	17
2.2.	Método de titulação por Karl-Fischer .....	17
2.3.	Método de extração.....	18
2.4.	Método de análise química por HPLC-DAD.....	19
2.4.1	Validação do método.....	20
2.5.	Avaliação das propriedades antioxidantes .....	21
2.5.1	Atividade captadora de radicais DPPH .....	21
2.5.2	Poder redutor .....	21
2.5.3	Inibição da descoloração do $\beta$ -caroteno .....	22
2.6.	Tratamento estatístico .....	22
Capítulo 3.	Resultados e Discussão.....	23
3.1.	Extração convencional.....	23
3.2.	Extração usando solventes não convencionais .....	25
3.3.	Efeito da concentração.....	29
3.4.	Efeito do tempo de extração .....	30
3.5.	Validação do método de extração.....	31
3.6.	Atividade antioxidante.....	33
Capítulo 4.	Conclusões e trabalho futuro .....	35
	Referências bibliográficas .....	37
	Anexo A. Retas de Calibração.....	41

# Capítulo 1. Introdução

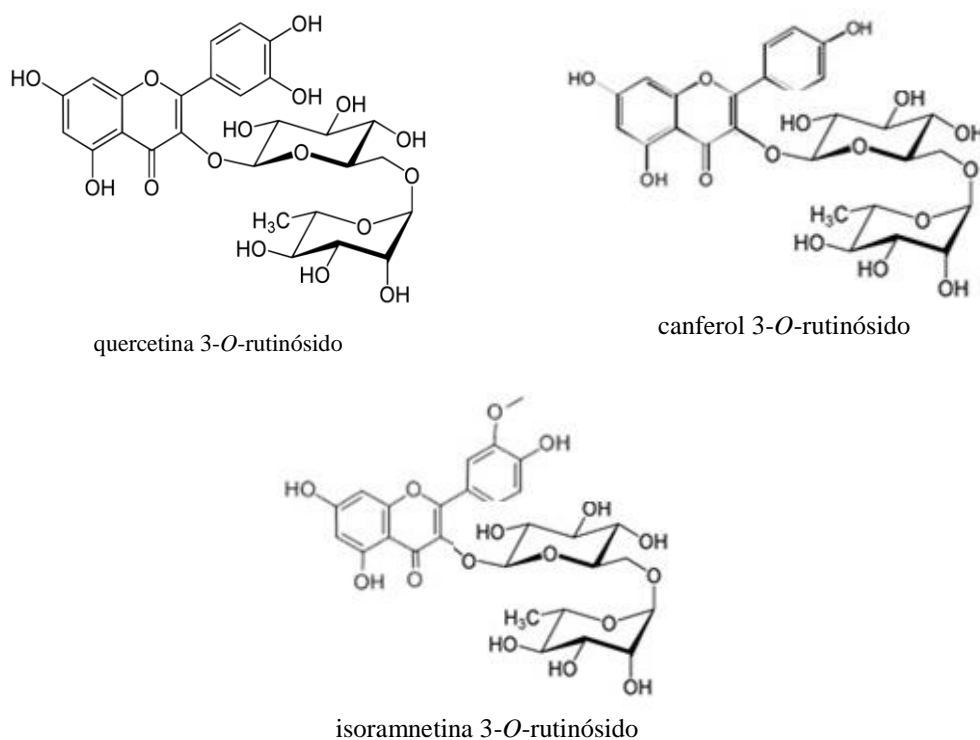
## 1.1. Enquadramento e objetivos deste trabalho

Muitas plantas medicinais contêm várias moléculas bioativas, tais como compostos fenólicos, compostos azotados e vitaminas, sendo utilizadas em produtos farmacêuticos e suplementos dietéticos (Du *et al.*, 2009). As plantas comestíveis, nomeadamente as verduras, são também uma fonte de polifenóis bioativos. Um exemplo é a espécie *Asparagus acutifolius* L., vulgarmente conhecido como corruda-menor, espargo-bravo-menor ou espargo-silvestre-menor e que já foi estudado pela equipa de investigação da Professora Isabel Ferreira, co-supervisora deste trabalho, do ponto de vista nutricional (Martins *et al.*, 2011), potencial antioxidante e antimicrobiano (Pinho *et al.*, 2014), composição em ácidos orgânicos (Pereira *et al.*, 2013), ácidos gordos (Pereira *et al.*, 2013), tocoferóis (Morales *et al.*, 2012) e compostos fenólicos (Barros *et al.*, 2011). Neste último trabalho, onde se efetuou uma extração convencional à temperatura ambiente com metanol:água (80:20%, v/v), obteve-se um perfil fenólico simples com três compostos: canferol 3-*O*-rutinósido, isoramnetina 3-*O*-rutinósido e quercetina 3-*O*-rutinósido (rutina) sendo o mais abundante a rutina (ver Figura 1.1) (Barros *et al.*, 2011).

Tradicionalmente, a extração de compostos fenólicos é realizada usando solventes orgânicos voláteis tais como metanol, etanol, acetona, acetato de etilo e suas combinações, podendo incluir diferentes proporções de água (Dai e Mumper, 2010). Estes solventes convencionais apresentam diversas desvantagens entre as quais toxicidade, inflamabilidade e volatilidade.

Neste trabalho, propõe-se a utilização de líquidos iónicos como solventes alternativos. Adicionalmente, para efeito de comparação com os líquidos iónicos de cadeia alquílica mais longa, foram também estudados outros surfactantes iónicos e não iónicos. Este tipo de compostos apresentaram já resultados promissores na extração de diferentes compostos químicos, incluindo bioativos (e.g., compostos fenólicos), não só evitando os

problemas ambientais associados a alguns solventes convencionais (e.g., solventes orgânicos), como também melhorando a seletividade e o rendimento de extração.



**Figura 1.1:** Estruturas químicas dos três compostos fenólicos estudados.

Assim, este trabalho tem como principal objetivo o estudo de solventes alternativos aos convencionais na extração de compostos fenólicos, bem como o estudo da atividade antioxidante dos extratos obtidos utilizando o solvente alternativo mais promissor.

## 1.2. Estrutura da dissertação

Este trabalho encontra-se dividido em 4 capítulos principais. O capítulo introdutório inclui uma revisão da literatura sobre a aplicação de líquidos iônicos e surfactantes como solventes de extração de compostos fenólicos de plantas. Posteriormente, descreve-se ainda a fundamentação teórica relativa aos principais métodos utilizados para a avaliação da atividade antioxidante dos extratos obtidos.

No segundo capítulo, descrevem-se as diversas metodologias experimentais aplicadas neste trabalho, nas etapas de extração, análise química e avaliação da atividade antioxidante.

Depois, os principais resultados obtidos experimentalmente são apresentados e discutidos no capítulo 3.

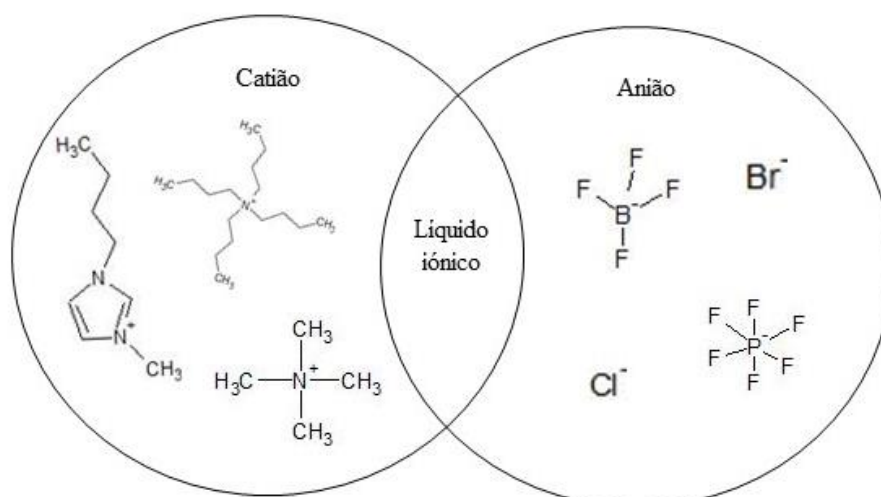
No último capítulo, apresentam-se as principais conclusões, propondo-se algumas sugestões de trabalho futuro.

No final, encontra-se ainda em anexo informação experimental mais detalhada que suporta o trabalho realizado.

### 1.3. Extração de produtos naturais

#### 1.3.1 Solventes não convencionais

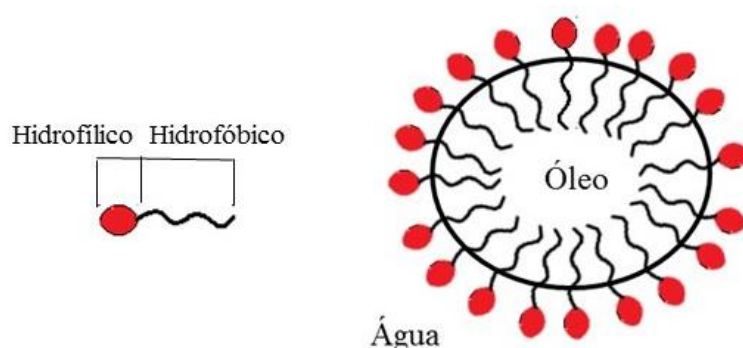
Os líquidos iônicos (LI) pertencem a um grupo composto por diversos sais que apresentam temperaturas de fusão abaixo dos 100 °C, devido à sua baixa densidade de carga e reduzida simetria entre os iões (Passos *et al.*, 2014). Em geral, estes sais são compostos por um catião orgânico e um anião orgânico ou inorgânico, permitindo inúmeras combinações de iões (Figura 1.2) e, assim, ajustar as suas propriedades termofísicas, a capacidade de biodegradação, as características toxicológicas e a sua hidrofobicidade, entre outras (Passos *et al.*, 2014).



**Figura 1.2:** Cátions e aniões comuns em líquidos iônicos, adaptado de Joshi e Anderson (2012).

Alguns investigadores têm sugerido que os LI podem formar agregados, devido à sua estrutura e carga inerente, sendo alguns LI estruturalmente semelhantes aos surfactantes, isto é, o líquido iónico possui um anião ou um catião hidrofílico e uma ou mais caudas hidrofóbicas. Estas propriedades podem levar à formação de micelas encontradas em alguns líquidos iónicos (Jungnickel *et al.*, 2008).

A formação dos agregados ocorre acima de uma certa concentração denominada de concentração micelar crítica (CMC) (Braga *et al.*, 2013). Na Figura 1.3 apresenta-se uma representação esquemática da formação de micelas.



**Figura 1.3:** Representação de uma micela, adaptado de Rinaldi *et al.* (2007).

Jungnickel *et al.* (2008) investigaram a dependência da concentração micelar crítica com o comprimento da cadeia alquílica do catião iónico 1-álquil-3-metilimidazólio, verificando, como esperado, que com o aumento da cadeia a CMC diminui, sendo apenas possível a formação de micelas a partir de 8 carbonos.

Por outro lado, Claudio *et al.* (2015) abordaram o comportamento de cadeias curtas de LI, verificando que os LI são uma potencial classe de hidrótopos onde tanto o catião como o anião contribuem energeticamente para aumentar a solubilidade em água de algumas biomoléculas pouco solúveis em água. A parte apolar, ou hidrofóbica dos hidrótopos é menor do que nos surfactantes tradicionais, não formando micelas nem apresentando CMC.

### 1.3.2 Exemplos de aplicação

Os líquidos iônicos têm recebido muita atenção em diversas aplicações tais como, catálise, síntese, limpeza industrial, extração e separação (Passos *et al.*, 2014). Possuem propriedades favoráveis, tais como, a reduzida volatilidade à temperatura ambiente e a capacidade de ajustar as propriedades físico-químicas que permitem obter uma vasta gama de solventes e uma melhor seletividade em diversos processos de extração e separação (Dai *et al.*, 2014). No entanto, alguns líquidos iônicos apresentam desvantagens quando utilizados como solventes de extração na indústria farmacêutica devido à elevada toxicidade de alguns dos seus constituintes e ao custo elevado da síntese dos seus componentes (Dai *et al.*, 2013).

Recentemente, Passos *et al.* (2014) apresentaram uma avaliação muito completa sobre a aplicação de líquidos iônicos como solventes de extração de compostos de valor acrescentado a partir de biomassa, incluindo os flavonoides ou ácidos fenólicos. A Tabela 1.1 apresenta uma compilação dos trabalhos dedicados à extração de flavonoides, mencionando o tipo e concentração de LI, a técnica de extração e condições de operação (temperatura  $T$ , razão sólido-líquido S/L e tempo de extração  $t$ ).

É importante referir que, em quatro dos sete trabalhos descritos, o método de extração utilizado foi assistido por micro-ondas.

Zeng *et al.* (2010) estudaram a extração de rutina a partir de duas fontes naturais, *Saururus chinensis* Lour. (Bail.) e *Flos sophorae* L., onde o LI escolhido como ótimo foi o [C<sub>4</sub>C<sub>1</sub>im]Br. No caso da planta *Saururus chinensis*, a concentração ótima foi de 2,5 M, à temperatura de extração de 70 °C, com tempo de extração de 5 min e razão sólido líquido S/L de 33:1 mg/ml. No caso da *Flos sophorae*, as condições ótimas foram um pouco mais extremas em termos de concentração de LI (3 M), temperatura (80 °C) e tempo de extração (10 min), para uma razão S/L de 40:1 mg/ml.

Outros autores (Du *et al.*, 2009) descreveram a extração de quercetina a partir de *Psidium guajava* L. (P.) e *Smilax china* L. (S.), onde o maior rendimento de extração foi obtido com [C<sub>4</sub>C<sub>1</sub>im][H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] e [C<sub>4</sub>C<sub>1</sub>im] Br, respetivamente. As restantes condições de extração foram otimizadas: concentração de 2,5 M, temperatura entre 60-80 °C, tempo de extração de 5 min e razão S/L 50:1 mg/ml.

Xu *et al.* (2012) aplicaram a mesma técnica à extração de canferol, miricetina e quercetina a partir de *Bauhinia championii* Benth., tendo o LI [C<sub>4</sub>C<sub>1</sub>im]Br apresentado melhor

rendimento de extração. Relativamente às restantes condições, uma razão S/L de 30:1 mg/ml, durante 10 min, a uma concentração de 2 M e à temperatura de 70 °C foram os valores ótimos.

O tamanho das partículas é também um fator importante aquando de uma extração; Xu *et al.* (2012) e Du *et al.* (2009) observaram que, para partículas menores do que 0,30-0,45 mm, o rendimento de extração é quase constante ou diminui. Quando as partículas são muito pequenas, as amostras tendem a aglomerar-se o que dificulta a extração.

Assim, em geral, o LI [C<sub>4</sub>C<sub>1</sub>mim]Br foi selecionado como o melhor solvente para extração de flavonoides pelo método assistido por micro-ondas, no intervalo de concentrações entre 2,0-3,0 M. A gama de temperaturas para um desempenho ótimo situou-se entre 60-80 °C, para um tempo de extração de 5-10 min e razão S/L entre 30:1-40:1 mg/ml.

Chowdhury *et al.* (2010) utilizaram um LI [N<sub>1100</sub>][N(C<sub>1</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>], à temperatura ambiente para melhorar a extração de taninos a partir de *Acacia catechu* Benth. e *Terminalia chebula* Retz.. O método de extração utilizado foi sólido-líquido, sendo sugerido como um processo energeticamente eficiente, uma vez que os materiais alvos são dissolvidos no LI à temperatura ambiente. Os resultados obtidos revelaram altas eficiências para *A. catechu* (85%) e *T. chebula* (75%).

(Sun *et al.*, 2011) descreveram a aplicação de LI na extração de flavonoides de origem natural através de ultrassons. O LI [C<sub>8</sub>C<sub>1</sub>im]Br foi considerado o melhor solvente seguido do [C<sub>6</sub>C<sub>1</sub>im]Br e metanol. Também o rendimento de extração em função da concentração foi estudado, com um máximo de rendimento obtido para a concentração de 0,5 M, verificando-se também que o aumento do tempo de extração (até 30 min) melhora significativamente o rendimento de extração. A razão sólido-líquido foi também investigada, sendo 33:1 mg/ml a razão ótima.

Por último, Zhou *et al.* (2015) demonstraram que as soluções de surfactantes baseados em LI apresentam ótima seletividade na extração de compostos fenólicos de *Chrysanthemum morifolium* Ramat, quando assistida por micro-ondas. No entanto, a sua capacidade de formar micelas e o tamanho das micelas são significativamente diferentes, devido principalmente ao comprimento da cadeia do grupo alquilo. Assim, estes autores testaram oito líquidos iónicos diferentes, fazendo variar o número de átomos de carbono do grupo alquilo entre 2 e 16. Verificou-se que o comprimento da cadeia hidrofóbica do

LI tem impacto significativo na eficiência de extração de flavonoides glicosilados. Em particular, o LI [C<sub>12</sub>mim]Br apresentou a maior eficiência de extração de todos os solventes com uma concentração de 0,25 M, durante 4 min e com uma razão sólido-líquido de 25:1 mg/ml.

## Introdução

**Tabela 1.1:** Extração de flavonoides utilizando soluções aquosas de LI e diferentes condições de extração.

Composto	Fonte natural	Técnica de extração	LI	Condições ótimas de extração	Referências
Canferol Miricetina Quercetina	<i>Bauhinia championii</i> Benth.	EAM	[C <sub>2</sub> C <sub>1</sub> im]Br, [C <sub>4</sub> C <sub>1</sub> im][BF <sub>4</sub> ], [C <sub>4</sub> C <sub>1</sub> im][H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ], [C <sub>4</sub> C <sub>1</sub> im][HSO <sub>4</sub> ], [C <sub>4</sub> C <sub>1</sub> im][PF <sub>6</sub> ], [C <sub>4</sub> C <sub>1</sub> im]2[SO <sub>4</sub> ], [C <sub>4</sub> C <sub>1</sub> im]Br, [C <sub>4</sub> C <sub>1</sub> im]Cl, [C <sub>6</sub> C <sub>1</sub> im]Br, [(HOOC)C <sub>1</sub> C <sub>1</sub> im]Cl	LI: [C <sub>4</sub> C <sub>1</sub> im]Br Concentração: 2,0 M T: 70 °C; t: 10 min Razão sólido/líquido (mg/ml): 30:1	(Xu <i>et al.</i> , 2012)
Quercetina	<i>Psidium guajava</i> L. (P.) e <i>Smilax china</i> L. (S.)	EAM	[C <sub>2</sub> C <sub>1</sub> im][BF <sub>4</sub> ], [C <sub>2</sub> C <sub>1</sub> im]Br, [C <sub>4</sub> C <sub>1</sub> im][BF <sub>4</sub> ], [C <sub>4</sub> C <sub>1</sub> im][C <sub>1</sub> SO <sub>4</sub> ], [C <sub>4</sub> C <sub>1</sub> im][H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ], [C <sub>4</sub> C <sub>1</sub> im][N(CN) <sub>2</sub> ], [C <sub>4</sub> C <sub>1</sub> im]Br, [C <sub>4</sub> C <sub>1</sub> im]Cl, [C <sub>4</sub> py]Cl, [C <sub>6</sub> C <sub>1</sub> im]Br	LI: [C <sub>4</sub> C <sub>1</sub> im][H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] (P.) LI: [C <sub>4</sub> C <sub>1</sub> im]Br (S.) Concentração: 2,5 M T: 60-80 °C; t: 5 min Razão sólido-líquido (mg/ml): 50:1	(Du <i>et al.</i> , 2009)
Rutina	<i>Saururus chinensis</i> Lour. (Bail.) (S.) e <i>Flos sophorae</i> L. (F.)	EAM	[C <sub>4</sub> C <sub>1</sub> im][BF <sub>4</sub> ], [C <sub>4</sub> C <sub>1</sub> im][TSO], [C <sub>4</sub> C <sub>1</sub> im]Br, [C <sub>4</sub> C <sub>1</sub> im]Cl	LI: [C <sub>4</sub> C <sub>1</sub> im]Br (S.) Concentração: 2,5 M T: 70 °C; t: 10 min Razão sólido-líquido (mg/ml): 33:1 LI: [C <sub>4</sub> C <sub>1</sub> im]Br (F.) Concentração: 3 M T: 80 °C; t: 10 min Razão sólido-líquido (mg/ml): 40:1	(Zeng <i>et al.</i> , 2010)
Luteolina-7- O-glucósido Apigenina 7- O-glucósido	<i>Chrysanthemum</i> <i>morifolium</i> Ramat	EAM	[C <sub>2</sub> mim]Br, [C <sub>4</sub> mim]Br, [C <sub>6</sub> mim]Br, [C <sub>8</sub> mim]Br, [C <sub>10</sub> mim]Br, [C <sub>12</sub> mim]Br, [C <sub>14</sub> mim]Br, [C <sub>16</sub> mim]Br, H <sub>2</sub> O, Etanol	LI: [C <sub>12</sub> mim]Br Concentração: 0,25 M T: 70 °C; t: 4 min Razão sólido-líquido (mg/ml): 25:1	(Zhou <i>et al.</i> , 2015)
(+)-Catechin	<i>Acacia catechu</i> Benth. e <i>Terminalia chebula</i> Retz.	ESL	[N <sub>1100</sub> ][N(C <sub>1</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> ]	T: temperatura ambiente t: 16 h	(Chowdhury <i>et al.</i> , 2010)

## Introdução

**Tabela 1.1:** Extração de flavonoides utilizando soluções aquosas de LI e diferentes condições de extração (continuação).

Composto	Fonte natural	Técnica de extração	LI	Condições ótimas de extração	Referências
Iristectorina A Iristectorina B Tectoridina	<i>Iris tectorun</i> Maxim.	EAU	[C <sub>4</sub> C <sub>1</sub> im][BF <sub>4</sub> ], [C <sub>6</sub> C <sub>1</sub> im]Br, [C <sub>8</sub> C <sub>1</sub> im]Br	LI: [C <sub>8</sub> C <sub>1</sub> im]Br Concentração: 0,5 M T: 70 °C; t: 30 min Razão sólido-líquido (mg/ml): 33:1	(Sun <i>et al.</i> , 2011)

EAM-extração assistida por micro-ondas

ESL-extração sólido-líquido

EAU-extração assistida por ultrassons

Além dos líquidos iônicos mencionados anteriormente, outros surfactantes iônicos e não iônicos têm tido uma relevância crescente na área de extração, podendo ser também uma alternativa quando utilizados em solução aquosa, a solventes orgânicos de baixa polaridade. Além disso, em muitas situações, os surfactantes apresentam rendimentos de extração competitivos em relação aos solventes orgânicos, estando alguns deles já aprovados em algumas aplicações nas indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica, como é o caso de lecitinas, Triton e Tween (Braga *et al.*, 2013).

Chang *et al.* (2011) estudaram a eficiência da extração de flavonoides específicos, tais como quercetina, quercetrina e rutina de flores de *Costus speciosus* (J.Konig) C.Specht, usando o método de extração líquida pressurizada (PLE) (Tabela 1.2). Os surfactantes utilizados foram o dodecil sulfato de sódio (SDS) e o Triton X-100. O solvente com maior rendimento de extração foi o SDS a uma concentração de 0,2% w/w em 30 min de extração (Chang *et al.*, 2011).

**Tabela 1.2:** Extração de flavonoides utilizando soluções aquosas de surfactantes e diferentes técnicas de extração.

Composto	Fonte natural	Técnica	Surfactante	Condições de operação ótimas	Referências
Quercetina Quercitrina Rutina	<i>Costus</i> <i>Speciosus</i> C.Specht	ELP	SDS, Triton X-100	SDS Concentração: 0,2% w/w t: 30 min	(Chang <i>et al.</i> , 2011)

ELP- extração líquida pressurizada

Como a informação relativa à extração de flavonoides com este tipo de solventes é reduzida, apresentam-se ainda dois casos modelo adicionais sobre extração de outros compostos bioativos de plantas.

Memon *et al.* (2010) estudaram a extração de ácido clorogénico (ácido fenólico) usando surfactantes. Utilizaram SDS, brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB) e Brij®35 em combinação com a técnica de extração por micro-ondas. Obtiveram uma extração ótima utilizando uma solução aquosa de SDS a 0,1 M, pH = 1, tempo de extração de 10 segundos e uma razão sólido/líquido de 20:1 mg/ml.

Noutro trabalho, Sun e Liu (2008) avaliaram a extração de alcaloides utilizando surfactantes e a técnica de extração por micro-ondas. Utilizaram como solventes o etanol, água, metanol, metanol (H<sup>+</sup>), Genapol X-080 e Genapol X-080 (H<sup>+</sup>), durante 10 min e uma razão sólido-líquido de 1:20 g/ml. Obtiveram como condições ótimas de extração a

utilização do solvente Genapol X-080 a uma concentração de 5 % (v/v) em água, razão sólido-líquido de 50:1 mg/ml durante 10 min, à temperatura de 100 °C.

#### 1.4. Atividade antioxidante

Um radical livre é constituído por qualquer átomo ou molécula contendo um ou mais eletrões desemparelhados na orbital exterior (Carocho e Ferreira, 2013) apresentando, nestas condições, uma forte reatividade com outras espécies químicas (Gawlik-Dziki *et al.*, 2013).

Quando a produção de espécies reativas, nomeadamente, radicais livres é excessiva, o equilíbrio entre estes e as defesas antioxidantes é afetado, e nestes casos, existe stresse oxidativo (Valle, 2011). Por outro lado, em concentrações mais baixas, as espécies reativas podem ser benéficas ao organismo uma vez que se encontram envolvidas em processos fisiológicos de sinalização e regulação (Fang *et al.*, 2002).

O enorme potencial antioxidante dos alimentos de origem vegetal é bastante benéfico para a saúde humana, estando muitas vezes relacionado com as propriedades dos compostos fenólicos presentes nessas matrizes (Gawlik-Dziki *et al.*, 2013).

##### 1.4.1 Atividade captadora de radicais DPPH

O DPPH, radical de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo é um radical livre estável devido à deslocalização do eletrão de reposição. A deslocalização de eletrões dá origem à cor violeta forte, caracterizado por uma banda de absorção centrada em solução de etanol a cerca de 517 nm. Quando uma solução de DPPH é misturada com a de um substrato, podendo doar um átomo de hidrogénio, esta dá lugar à forma reduzida perdendo a cor violeta e tornando-se amarelo pálido (Zahra *et al.*, 2007, Alam *et al.*, 2013). A reação pode ser representada pela seguinte equação:



em que  $X \cdot$  representa o radical DPPH e AH representa os antioxidantes presentes na amostra.

A fim de avaliar a atividade antioxidante através da captação de radicais livres, monitoriza-se a alteração na absorvância de radicais DPPH. A percentagem de captação de radicais DPPH é calculada usando a equação dada a seguir:

$$\% \text{ captação de radicais DPPH} = \frac{(A_{ar} - A_{dr})}{A_{ar}} * 100 \quad (2)$$

onde  $A_{ar}$  é a absorvância antes da reação (apenas na presença da solução de DPPH) e  $A_{dr}$  é a absorvância depois da reação (já com a amostra) (Heleno *et al.*, 2010, Alam *et al.*, 2013).

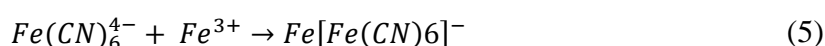
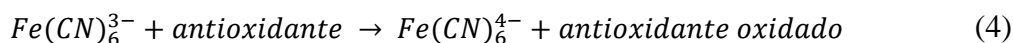
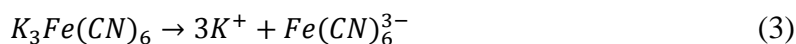
#### 1.4.2 Poder Redutor

A avaliação do poder redutor baseia-se no princípio da absorvância das misturas de reação, onde um aumento da absorvância indica um aumento da atividade antioxidante.

Neste método, o composto antioxidante forma um complexo corado com ferricianeto de potássio, ácido tricloroacético e cloreto férrico, reduzindo o complexo Fe(III)/ferricianeto  $[\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]^-$  a Fe(II).

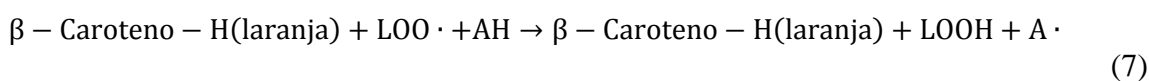
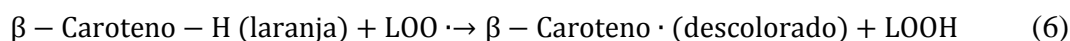
Deste modo, dependendo do poder redutor dos compostos, a cor amarela da solução do ensaio altera-se para tons de verde-escuro, a qual é medida a 690 nm (Heleno *et al.*, 2010, Reis *et al.*, 2011, Alam *et al.*, 2013).

A reação de redução pode ser expressa pelas seguintes equações químicas:



#### 1.4.3 Inibição da descoloração do $\beta$ -caroteno

O método da inibição da descoloração de  $\beta$ -caroteno baseia-se na medição no espectrofotômetro da descoloração do  $\beta$ -caroteno, sendo possível, assim avaliar a capacidade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (Amarowicz *et al.*, 2004). As reações podem ser descritas da seguinte forma:



onde  $LOO \cdot$  representa o radical livre linoleato que está envolvido no mecanismo de descoloração dos carotenoides através da oxidação térmica, que pode ser diminuída pela ação de antioxidantes presentes nas amostras (Amarowicz *et al.*, 2004).

Assim, quanto maior a quantidade de antioxidantes nas amostras, menor será a descoloração do  $\beta$ -caroteno.

A inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno pode ser calculada utilizando a seguinte equação (Heleno *et al.*, 2010, Reis *et al.*, 2011):

$$\text{Inibição da descoloração (\%)} = \left[ \left( \frac{A_{t=2h}}{A_{t=0h}} \right) * 100 \right] \quad (8)$$



## Capítulo 2. Materiais e Métodos

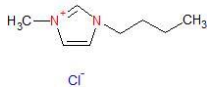
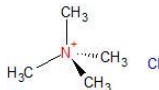
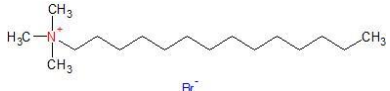

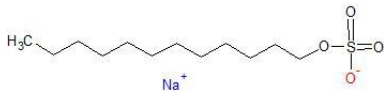
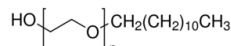
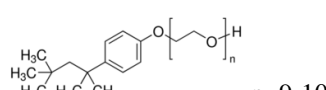
Neste capítulo, será apresentado o trabalho experimental, descrevendo-se os materiais e os métodos utilizados.

### 2.1. Materiais

#### 2.1.1 Ensaio de extração

Na Tabela 2.1 apresentam-se a pureza e o fabricante dos líquidos iônicos e/ou surfactantes utilizados neste trabalho como solventes.

**Tabela 2.1:** Origem e pureza dos solventes utilizados neste trabalho.

Composto	Fórmula química	Pureza	Fabricante
Cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (C <sub>4</sub> mimCl)		≥ 0,99	Iolitec
Cloreto de tetrametilamónio (N <sub>1111</sub> Cl)		≥ 0,98	Fluka Analytical
Brometo de miristiltrimetilamónio (MTABr)		≥ 0,98	Alfa Aesar
Cloreto de cetilpiridínio mono-hidratado (CPyrCl)		≥ 0,98	Alfa Aesar
Dodecil sulfato de sódio (SDS)		≥ 0,99	AppliChem Panreac
Genapol® X-080			Sigma-Aldrich
Triton™ X-100			Sigma-Aldrich

A marca Triton<sup>TM</sup> X-100 representa um detergente não iónico, produzido a partir de octilfenol polimerizado. O número “100” refere-se ao número de unidades de óxido de etileno na estrutura. X tem uma média de 9,5 de unidades de óxido de etileno por molécula com massa molecular de 625,1 g/mol (Sigma-Aldrich).

A marca Genapol® X-080 refere-se a um emulsionante não iónico representando o número “080” o número de unidades de óxido de etileno na sua estrutura (Sigma-Aldrich). O metanol foi obtido através LAB-SCAN Analytical sciences com um grau de pureza de  $\geq 0,99$ . Utilizou-se água ultrapura, obtida no sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, EUA).

Na Tabela 2.2 apresentam-se ainda algumas propriedades relevantes dos solventes usados neste trabalho.

**Tabela 2.2:** Temperatura de fusão ( $T_f$ ) e concentração micelar crítica (CMC) dos solventes utilizados neste trabalho.

Composto	CMC/mM (20 °C)	$T_f$ /°C
Cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio	---	70 <sup>e</sup>
Cloreto de tetrametilamónio	---	300 <sup>f</sup>
Brometo de miristiltrimetilamónio	3,71 <sup>a</sup>	245-250 <sup>g</sup>
Cloreto de cetilpiridínio mono-hidratado	1-1,01 <sup>b</sup>	73 <sup>h</sup>
Dodecil sulfato de sódio	8,02-8,03 <sup>b</sup>	204-207 <sup>i</sup>
Genapol® X-080	0,06-0,15 <sup>c</sup>	41-45 <sup>j</sup>
Triton <sup>TM</sup> X-100	0,2 <sup>d</sup>	5 <sup>k</sup>

<sup>a</sup>Ruiz *et al.* (2007); <sup>b</sup>Chatterjee *et al.* (2001); <sup>c</sup>Ficha de Produto-Genapol® X-080 (Sigma-Aldrich); <sup>d</sup>Ficha de Produto-Triton<sup>TM</sup> X-100 (Sigma-Aldrich); <sup>e</sup>Ficha de Produto-1-Butyl-3-methylimidazolium chloride (Sigma-Aldrich); <sup>f</sup>Ficha de Produto-Tetramethylammonium chloride (Sigma-Aldrich); <sup>g</sup>Ficha de Produto- (Sigma-Aldrich); <sup>h</sup>(Hough-Troutman *et al.*, 2009); <sup>i</sup> Ficha de Produto-Sodium dodecyl sulfate (Sigma-Aldrich); <sup>j</sup> Ficha de Produto-Genapol® X-080 (Book); <sup>k</sup> Ficha de Produto-Triton X-100 (Block)

### 2.1.2 Ensaios de análise química

O acetonitrilo de grau HPLC foi adquirido à empresa Merck (Darmstadt, Alemanha) e o ácido fórmico à empresa Prolabo (VWR International, França).

### **2.1.3 Ensaios de avaliação da atividade antioxidante**

O padrão utilizado nos ensaios da atividade antioxidante foi o trolox que foi adquirido na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O DPPH foi obtido na empresa Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EUA). Todos os outros produtos químicos e solventes eram de grau analítico e foram adquiridos a fornecedores comuns.

### **2.1.4 Amostras de planta**

As amostras da planta *Asparagus acutifolius* L. (corruda-menor, espargo-bravo-menor ou espargo-silvestre-menor) foram recolhidas em 2009 pela Prof. Ana Maria Carvalho da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, no início da primavera, em Bragança de acordo com as recomendações de consumidores locais. Os brotos de espargos correspondem a jovens hastes que brotam a partir do rizoma de metro, e têm mais ou menos 20 cm de comprimento. A espécie foi depositada no herbanário da Escola Superior Agrária de Bragança. As amostras foram liofilizadas e mantidas nas melhores condições para o uso subsequente (Barros *et al.*, 2011).

## **2.2. Método de titulação por Karl-Fischer**

As soluções aquosas foram preparadas em massa, utilizando uma balança analítica, Denver Instrument, com incerteza de  $\pm 0,1$  mg. A quantidade de água nos sólidos higroscópicos foi avaliada pelo método de Karl-Fischer. Este método é um dos mais usados para aferir o teor de água em diversas amostras líquidas ou sólidas (Merkh *et al.*, 2012). Para a titulação foi utilizado o equipamento Metrohm 736 GP Titrino + 703 Ti Stand (Figura 2.1).

O método de Karl-Fischer consiste na titulação de uma amostra sólida diluída num solvente adequado, com o reagente Karl-Fischer (solução contendo iodo, dióxido de enxofre e uma amina). Na presença de água, quer o iodo quer o dióxido de enxofre são consumidos rapidamente, pelo que a sua medição pode ser realizada e relacionada com o teor de água na amostra analisada. O ponto final da titulação pode ser detetado visualmente pela mudança de cor provocada pelo iodo (Merkh *et al.*, 2012).



Figura 2.1: Equipamento de titulação de Karl-Fischer.

Inicialmente, mediu-se o teor de água numa amostra de etanol obtendo-se assim um volume de titulante de referência. Depois, mediu-se o teor de água das soluções etanólicas dos sólidos em estudo. Para isso, dissolveu-se cerca de 0,5 g de sólido, medido de forma precisa numa balança analítica, em cerca de 10 ml de etanol. Posteriormente, procedeu-se à titulação. Este procedimento foi repetido três vezes.

Os resultados obtidos para os diferentes solventes estão apresentados na seguinte tabela.

**Tabela 2.3:** Teor de água para os diferentes LI.

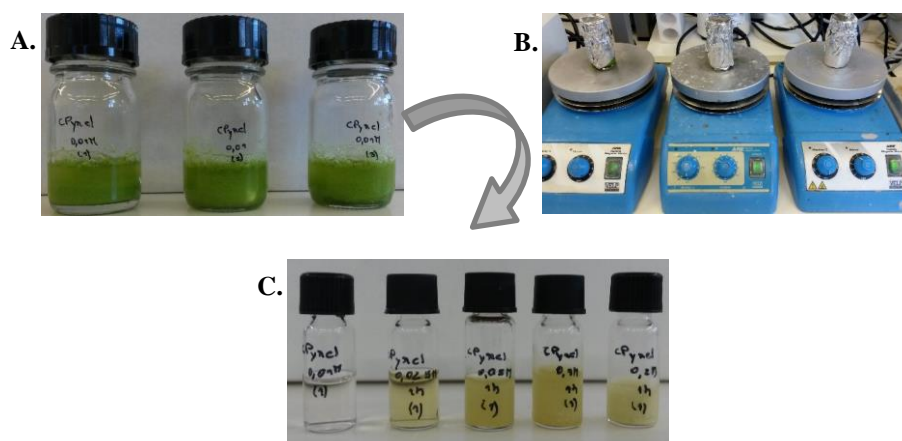
Solvente	Fração mássica de água (média $\pm$ DP, %)
C <sub>4</sub> mimCl	2,29 $\pm$ 0,09
N <sub>1111</sub> Cl	0,67 $\pm$ 0,07
CPyrCl	6,17 $\pm$ 0,04
MTABr	0,17 $\pm$ 0,08

Como seria expectável, verifica-se que o cloreto de cetilpiridínio, por ser um sólido monohidratado, apresenta maior teor de água, sendo menos significativa nos restantes solventes. Os valores apresentados foram tidos em consideração na preparação das soluções aquosas de cada um dos compostos.

### 2.3. Método de extração

Cada amostra (300 mg) foi extraída com 10 ml de solvente num frasco, com agitação magnética. No fim da extração, retirou-se 1 ml da solução de extrato, levando-se a centrifugar. Posteriormente, e de forma a diluir o extrato para metade, retirou-se 500  $\mu$ l

do sobrenadante do extrato centrifugado e adicionou-se 500  $\mu$ l de água. A amostra assim diluída foi filtrada através de um filtro descartável LC de 0,22  $\mu$ m, transferida para um vial de injeção para posterior análise por HPLC. Na Figura 2.2, apresenta-se uma representação esquemática das principais etapas.



**Figura 2.2:** Representação esquemática do processo de extração: **A.** Mistura inicial de planta + solvente; **B.** Processo de extração com agitação magnética; **C.** Amostras de soluções do extrato para análise por HPLC.

#### **2.4. Método de análise química por HPLC-DAD**

Tendo em conta que o perfil fenólico da amostra já tinha sido previamente caracterizado pelo grupo da Prof. Isabel Ferreira utilizando HPLC-DAD (Barros *et al.*, 2011), procedeu-se à monitorização das extrações com uma análise nas mesmas condições. Os extratos fenólicos foram analisados usando um cromatógrafo Shimadzu 20A serie UFLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), com uma bomba quaternária, um detetor de arranjo de díodos (DAD) e uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C<sub>18</sub> (3  $\mu$ m, 4,6  $\times$  150 mm), mantida a 35 °C (ver Figura 2.3).



Figura 2.3: Equipamento HPLC-DAD.

Foram utilizados os seguintes solventes: solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (solvente A) e acetonitrilo (solvente B). O gradiente de eluição foi estabelecido a 15% de B durante os primeiros 5 min 25% de B de 5 a 10 min, 35% de B de 10 a 20 min, isocrática com 40% de B durante os 20 min até aos 35 min, 15% de B dos 35 min até aos 55 min. Foi utilizado um caudal de 0,5 ml/min, sendo a detecção realizada *online* no DAD, utilizando 370 nm como comprimentos de onda.

Os compostos fenólicos foram caracterizados de acordo com os seus espectros de UV e tempo de retenção em comparação com os padrões. A eficiência das extrações foi determinada pela análise quantitativa, através da obtenção de curvas de calibração de quercetina 3-*O*-rutinosido (rutina) e canferol-3-*O*-rutinosido, preparadas em MeOH:H<sub>2</sub>O e LI CPyrCl, utilizando concentrações conhecidas (Anexo A). Utilizaram-se as retas de quercetina 3-*O*-rutinosido para quantificar a isoramnetina 3-*O*-rutinosido uma vez que este composto é um derivado metilado de quercetina 3-*O*-rutinosido. Os resultados foram expressos em mg/g de material seco.

#### 2.4.1 Validação do método

A linearidade e a sensibilidade da análise cromatográfica foram determinadas e o método de extração foi validado pela repetibilidade instrumental, precisão e exatidão, utilizando a amostra de *A. acutifolius*.

A precisão foi estudada através da análise da amostra sete vezes no mesmo dia. A repetibilidade foi determinada a partir de três extrações de uma mesma amostra sendo

cada uma analisada três vezes no mesmo dia. A recuperação do método de extração foi avaliada pelo procedimento de adição de padrão (percentagem de recuperação), com três níveis de adição (50, 25 e 10% do pico de concentração/área) cada um em triplicado. O padrão fenólico (quercetina-3-*O*-rutinosídeo) foi adicionado à amostra e o procedimento de extração foi levado a cabo.

## **2.5. Avaliação das propriedades antioxidantes**

Foram aplicados três ensaios *in vitro* para avaliar a atividade antioxidante das amostras. As extrações foram realizadas por agitação magnética de 300 mg da amostra com 10 ml de solvente, como referido anteriormente, durante 1 h, sendo o extrato obtido filtrado através de filtros de papel Whatman N° 4. Foram utilizadas diferentes concentrações de extratos (15-0,2345 µg/ml) para encontrar os valores de EC<sub>50</sub> (concentração de amostra responsável por 50% da atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor). Em todos os ensaios foi utilizado o trolox como controlo positivo.

### **2.5.1 Atividade captadora de radicais DPPH**

Esta metodologia foi realizada utilizando uma microplaca de 96 poços. A mistura de reação em cada um dos poços foi constituída pelas diferentes concentrações de extrato (30 µl) com 270 µl da solução metanólica de DPPH ( $6 \cdot 10^{-5}$  mol/l). Cada mistura foi deixada em repouso, durante 60 min, ao abrigo da luz. A redução do radical DPPH foi determinada por medição da absorvância a 515 nm no leitor de microplacas ELX800 (equipamento Bio-Tek, Inc., Winooski, VT, USA).

### **2.5.2 Poder redutor**

As diferentes concentrações de extrato (500 µl) foram misturadas em *eppendorfs*, com 500 µl de tampão de fosfato de sódio (pH=6,6, 200 mM) e 500 µl de ferricianeto de potássio (1% m/v). A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min e, posteriormente, foi adicionado 500 µl de ácido tricloroacético 10%. De seguida pipetou-se 800 µl do sobrenadante dos *eppendorfs* em microplacas de 48 poços juntamente com 160 µl de água desionizada e 160 µl de cloreto férrico. A absorvância foi medida a 690 nm no leitor de microplacas anteriormente mencionado.

### **2.5.3 Inibição da descoloração do $\beta$ -caroteno**

Preparou-se uma solução de  $\beta$ -caroteno por dissolução em clorofórmio. Depois, pipetou-se 2 ml desta solução para um balão de 100 ml de fundo redondo. Após a remoção do clorofórmio sob vácuo a 40 °C, adicionou-se ao balão sob agitação vigorosa, 400 mg de emulsificador Tween 80, 40 mg de ácido linoleico e 100 ml de água destilada. Transferiram-se 4800  $\mu$ l da emulsão para tubos de ensaio, previamente preparados, contendo 200  $\mu$ l das diferentes concentrações de extrato e foi medida a absorvância a 470 nm (espectrofotômetro Analytik jena 200, Jena, Alemanha) a tempo zero (T0) com prévia agitação dos tubos. Posteriormente, os tubos foram incubados a 50 °C, com agitação de 50 rpm durante 120 min, e de seguida foi feita a leitura da absorvância a 470 nm a tempo 120 (T120) com prévia agitação dos tubos.

### **2.6. Tratamento estatístico**

Utilizaram-se, para cada preparação, três amostras e todos os ensaios foram realizados em triplicado. Os resultados foram expressos como valores médios  $\pm$  desvio padrão correspondentes (DP). Os resultados foram analisados por uma análise *one-way* de variância a (ANOVA) seguida de teste HSD *Tukey's* com  $\alpha = 0,05$ . Em alguns resultados foi usado um teste *t*-student porque havia menos de três grupos de resultados. Este tratamento estatístico foi realizado pelo programa SPSS v. 22.0.

## Capítulo 3. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos utilizando solventes não convencionais serão comparados com os resultados de uma extração convencional com metanol:água (80:20%, v/v). Na primeira secção, apresenta-se essa informação, que será utilizada como referência na restante discussão dos resultados.

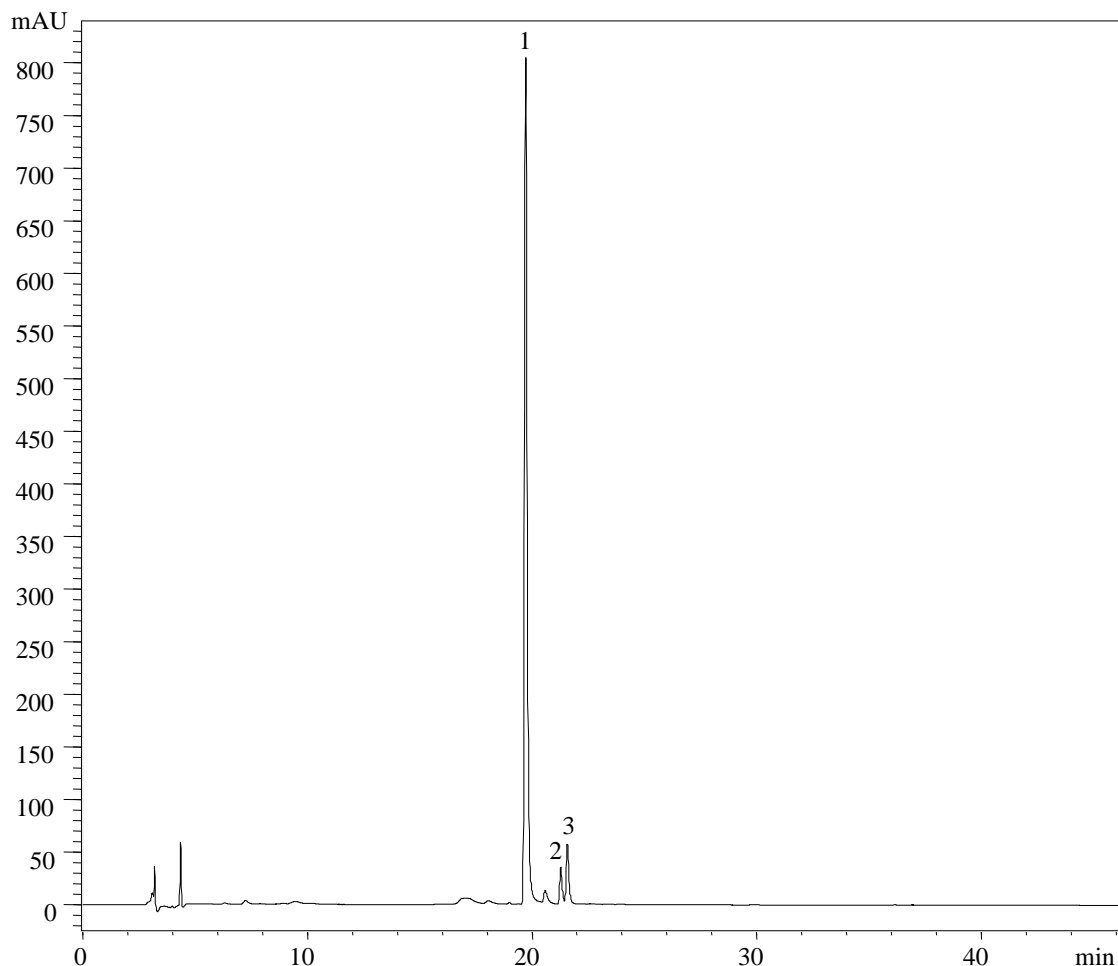
Na segunda secção, apresentam-se os resultados da extração utilizando solventes não convencionais. Inicialmente, foram efetuados ensaios com dois compostos iônicos: cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (C<sub>4</sub>mimCl) e cloreto de tetrametilamónio (N<sub>1111</sub>Cl). Numa segunda fase, foram testados outros dois LI, capazes de formar micelas, cloreto de cetilpiridínio (CPyrCl) e brometo de miristiltrimetilamónio (MTABr). Dados os bons resultados obtidos em particular com estes dois últimos compostos, foram ainda testados dois surfactantes não iônicos comerciais (Genapol X-080 e Triton X-100) e o surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS).

Nas secções 3.3 e 3.4 avaliou-se o efeito da concentração e do tempo de extração, respetivamente. Na secção 3.5 fez-se a validação do método de extração utilizando o solvente ótimo, avaliado pela determinação da linearidade e limites de detecção e de quantificação. Na secção 3.6, a atividade antioxidante da amostra (*A. acutifolius*) em estudo foi avaliada através de três métodos: efeito captador de radicais livres (DPPH), poder redutor e inibição da descoloração do β-caroteno.

### 3.1. Extração convencional

Num trabalho anterior, Barros *et al.* (2011) apresentaram os resultados da extração convencional de *A. acutifolius*, à temperatura ambiente, com metanol: água (80:20%, v/v). Descreveram um perfil fenólico contendo três flavonoides e um ácido fenólico, sendo o composto fenólico mais abundante a rutina (quercetina 3-*O*-rutinosido).

O perfil obtido nas extrações das amostras em estudo foi igual ao obtido no estudo de Barros *et al.* (2011) com as mesmas condições (representado na Figura 3.1), focando-nos apenas nos flavonoides, dado que são os compostos maioritários.



**Figura 3.1:** Perfil de compostos fenólicos de extrato de *Asparagus acutifolius*, utilizando metanol: água (80:20%, v/v), registrado a 370 nm. 1- Quercetina 3-*O*-rutinósido; 2- Canferol 3-*O*-rutinósido; 3- Isoramnetina 3-*O*-rutinósido.

Os picos foram confirmados de acordo com o estudo de Barros *et al.* (2011), onde se pode verificar que o pico de maior intensidade foi o pico 1, identificado como quercetina 3-*O*-rutinósido (rutina) de acordo com o seu tempo de retenção, espectro de UV e características de massa em comparação com um padrão. Os picos 2 e 3 mostraram  $\lambda_{max}$  a 346 e 354 nm, e iões moleculares a  $m/z$  593 e 623, libertando cada um deles um fragmento  $MS^2$  a  $m/z$  285 e 315, respetivamente, consistente com a perda de um ramnosil-glucósido (308 um). As características do espectro UV e de massa permitiram a identificação como canferol 3-*O*-rutinósido e isoramnetina 3-*O*-rutinósido, respetivamente (Barros *et al.*, 2011).

Na Tabela 3.1 estão representados os resultados obtidos neste trabalho, aplicando dois métodos de extração convencionais. Um deles refere-se à extração hidrometanólica, utilizando como solvente uma mistura de metanol: água (80:20%, v/v), durante 1 h, à temperatura ambiente (18 °C). O outro método designa-se por decocção, simulando assim uma cozedura, sendo a forma em que esta verdura é habitualmente consumida, consistindo numa extração com água, durante 5 min, à temperatura de 100 °C.

A concentração dos compostos fenólicos foi utilizada para calcular a eficiência da extração, de acordo com a seguinte expressão:

$$\text{Eficiência da extração (mg/g)} = \frac{\text{massa de composto fenólico (mg)}}{\text{massa de planta (g)}} \quad (10)$$

**Tabela 3.1:** Quantificação de compostos fenólicos, usando métodos convencionais de extração.

Tipo de extração	Eficiência da extração (média ± DP, mg/g)		
	quercetina 3-O-rutinósido	canferol 3-O-rutinósido	isoramnetina 3-O-rutinósido
MeOH:H <sub>2</sub> O (80:20%, v/v)	2,68±0,15	0,09±0,01	0,46±0,03
Decocção	1,23±0,12	0,02±0,001	0,31±0,01
Valor de <i>p</i> teste <i>t</i> -Student	<0,001	<0,001	<0,001

Analisando os resultados obtidos, é possível verificar que a água foi menos eficiente na extração de compostos fenólicos de *A. acutifolius*, mesmo a temperaturas elevadas, comparativamente com a mistura de solventes MeOH:H<sub>2</sub>O, à temperatura ambiente.

### 3.2. Extração usando solventes não convencionais

Os LI são solventes recentes, aplicados na extração de compostos, tendo a estrutura de cada LI efeito significativo sobre as suas propriedades físico-químicas, o que pode afetar a eficiência de extração dos compostos alvo (Sun *et al.*, 2011).

A primeira seleção de solventes incluiu dois compostos iónicos, em que se escolheu um contendo o catião C<sub>4</sub>mim<sup>+</sup>, considerando a informação recolhida na revisão bibliográfica.

Dada a sua disponibilidade foi testado o líquido iônico cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (C<sub>4</sub>mimCl), apesar do anião ser diferente.

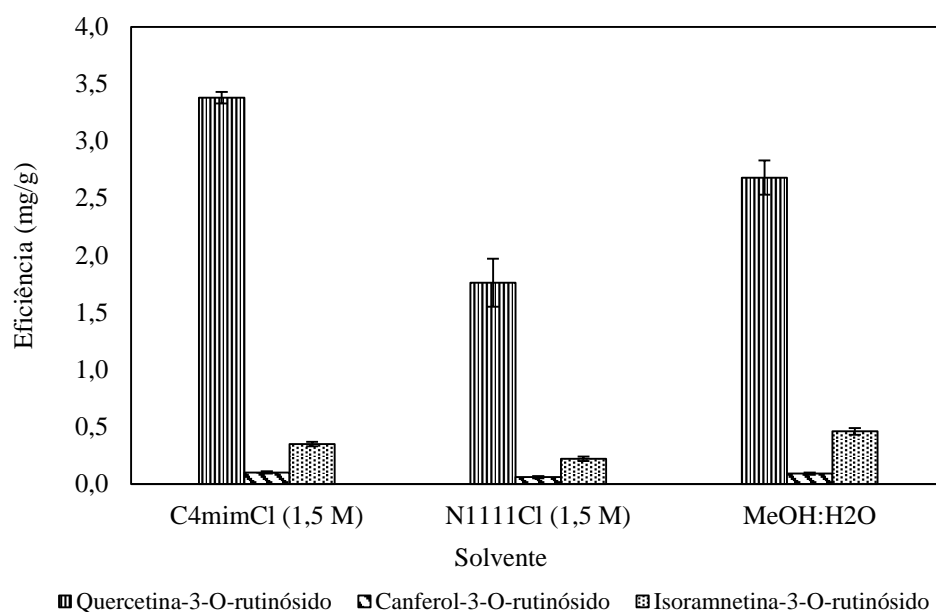
Neste estudo, as duas soluções de C<sub>4</sub>mimCl e N<sub>1111</sub>Cl foram estudadas nas seguintes condições de extração, adotadas já no método convencional: tempo de extração de 1 hora, razão sólido-líquido 0,3 g/10 ml e temperatura ambiente. A concentração de 1,5 M foi a testada, tendo em conta a gama de concentrações ótima descrita na literatura (1,5 M - 2,5 M).

Na Tabela 3.2 estão representados os resultados obtidos nas diversas extrações com soluções aquosas de líquidos iônicos.

**Tabela 3.2:** Quantificação de compostos fenólicos extraídos, após 1 hora, utilizando líquidos iônicos com concentração 1,50 M.

Solvente	Eficiência da extração (média ± DP, mg/g)		
	quercetina 3-O-rutinósido	canferol 3-O-rutinósido	isoramnetina 3-O-rutinósido
C <sub>4</sub> mimCl	3,38±0,05	0,10±0,01	0,35±0,02
N <sub>1111</sub> Cl	1,76±0,21	0,06±0,001	0,22±0,02
Valor de <i>p</i> teste <i>t</i> -Student	<0,001	0,009	0,001

Relativamente a estes compostos iônicos, é notório que o C<sub>4</sub>mimCl apresenta uma maior eficiência de extração, superior ao desempenho da solução aquosa de metanol, para o composto maioritário, quercetina 3-O-rutinósido (Figura 3.2).



**Figura 3.2:** Efeito dos líquidos iônicos sobre a eficiência de extração de compostos fenólicos.

A segunda seleção de solventes incluiu dois surfactantes: o cloreto de cetilpiridínio (CPyrCl) e brometo de miristiltrimetilamônio (MTABr). Escolheu-se ainda um surfactante aniônico, o dodecil sulfato de sódio (SDS). Adicionalmente, com base na revisão bibliográfica, foram testados dois surfactantes não iônicos: Triton X-100 e Genapol X-080.

As condições de extração foram as mesmas para todos os surfactantes iônicos: tempo de extração 1 hora, razão sólido-líquido 0,3 g/10 ml, temperatura ambiente e concentração de 0,10 M, tendo em conta os resultados reportados na literatura. Para efeitos de comparação, efetuou-se ainda um ensaio com C<sub>4</sub>mimCl, com concentração de 0,1 M.

Para o Triton X-100 e Genapol X-080 foram utilizadas concentrações diferentes, 0,1% e 0,2% (v/v), respetivamente. Uma vez mais, estas concentrações foram escolhidas com base em resultados apresentados na literatura (Sun e Liu, 2008, Chang *et al.*, 2011).

Os resultados da eficiência da extração de quercetina 3-*O*-rutinosídeo, canferol 3-*O*-rutinosídeo e isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo são mostrados na Tabela 3.3, para os diferentes solventes.

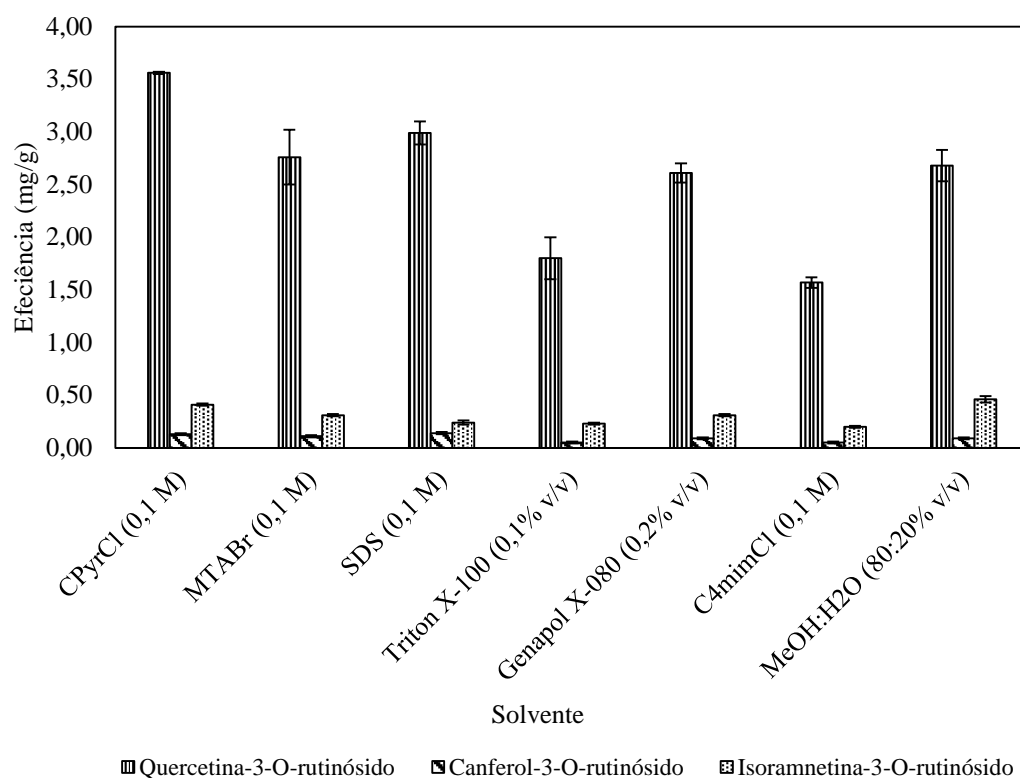
**Tabela 3.3:** Quantificação de compostos fenólicos extraídos após 1 hora, utilizando surfactantes.

Solvente	Eficiência da extração (média ± DP, mg/g)		
	Quercetina 3- <i>O</i> -rutinósido	canferol 3- <i>O</i> -rutinósido	isoramnetina 3- <i>O</i> -rutinósido
C <sub>4</sub> mimCl	1,57±0,05 <sup>d</sup>	0,05±0,001 <sup>c</sup>	0,20±0,01 <sup>d</sup>
MTABr	2,76±0,26 <sup>bc</sup>	0,11±0,01 <sup>a</sup>	0,31±0,01 <sup>b</sup>
SDS	2,99±0,11 <sup>b</sup>	0,14±0,01 <sup>a</sup>	0,24±0,02 <sup>c</sup>
CPyrCl	3,56±0,01 <sup>a</sup>	0,13±0,01 <sup>a</sup>	0,41±0,01 <sup>a</sup>
Genapol X-080	2,61±0,09 <sup>c</sup>	0,09±0,001 <sup>b</sup>	0,31±0,01 <sup>b</sup>
Triton X-100	1,80±0,20 <sup>d</sup>	0,05±0,001 <sup>c</sup>	0,23±0,01 <sup>c</sup>

Em cada coluna, letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Relativamente aos surfactantes, claramente, a utilização de CPyrCl resultou em maiores eficiências de extração para a quercetina 3-*O*-rutinósido e isoramnetina 3-*O*-rutinósido. Em segundo lugar, relativamente à extração do composto maioritário quercetina 3-*O*-rutinósido, fica o solvente SDS, seguindo o MTABr e o Genapol X-080, tal como se pode observar na Figura 3.3.

Para prosseguir a etapa de otimização do processo de extração, foi utilizado não só o critério de eficiência de extração, mas também a facilidade de utilização desse solvente em análises químicas por HPLC. De facto, verificou-se que as amostras dos extratos de SDS e Genapol X-080 causam subidas acentuadas de pressão na coluna do HPLC (cerca de 10-12 bar), tornando-os inadequados para análise rotineira de compostos fenólicos nas condições estabelecidas no laboratório.



**Figura 3.3:** Efeito dos surfactantes sobre a eficiência de extração de compostos fenólicos.

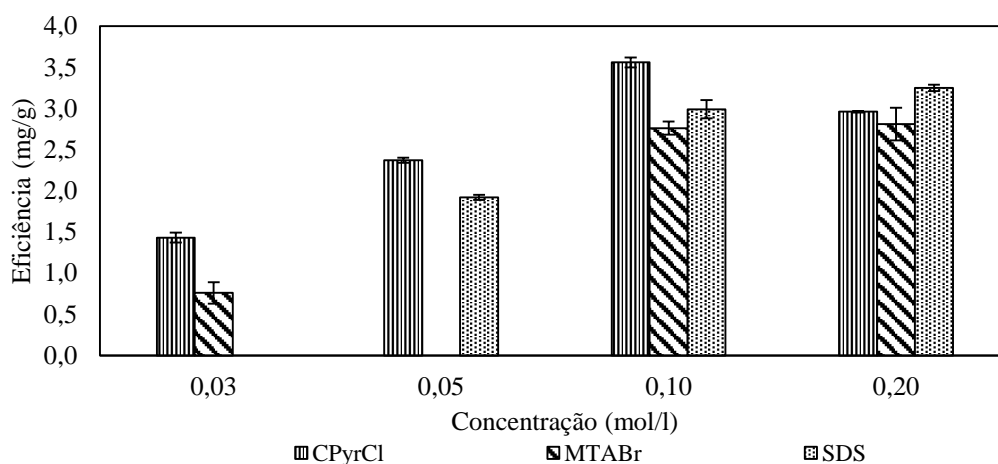
### 3.3. Efeito da concentração

O estudo de otimização da concentração foi efetuado para as soluções aquosas de CPyrCl, SDS e MTABr. É possível verificar através da Figura 3.4 e da Tabela 3.4 que, aumentando a concentração de 0,1 para 0,2 mol/l, existe um pequeno aumento da eficiência de extração de quercetina 3-*O*-rutinósido apenas para o SDS. Relativamente ao MTABr não são visíveis diferenças significativas da eficiência de extração entre 0,1 e 0,2 mol/l. No entanto para o CPyrCl existe uma melhor eficiência para uma concentração de 0,1 M. Finalmente, para a escolha do melhor solvente/concentração teve-se em conta a eficiência da extração e o seu desempenho nas análises químicas por HPLC. Assim, selecionou-se a solução aquosa de CPyrCl 0,1 mol/l como ótima, que comparativamente com o método convencional apresenta uma eficiência de extração significativamente melhor.

**Tabela 3.4:** Quantificação de compostos fenólicos extraídos após 1 hora, em função da concentração do solvente.

Solvente	Molaridade	Eficiência de extração (média ± DP, mg/g)		
		quercetina 3-O-rutinósido	canferol 3-O-rutinósido	isoramnetina 3-O-rutinósido
MTABr	0,025	0,76±0,13 <sup>b</sup>	0,02±0,001 <sup>b</sup>	0,09±0,001 <sup>c</sup>
	0,10	2,76±0,08 <sup>a</sup>	0,11±0,01 <sup>a</sup>	0,31±0,01 <sup>a</sup>
	0,20	2,81±0,20 <sup>a</sup>	0,14±0,01 <sup>a</sup>	0,23±0,01 <sup>b</sup>
SDS	0,05	1,92±0,03 <sup>c</sup>	0,02±0,001 <sup>c</sup>	0,09±0,001 <sup>c</sup>
	0,10	2,99±0,11 <sup>b</sup>	0,14±0,01 <sup>a</sup>	0,24±0,02 <sup>a</sup>
	0,20	3,25±0,04 <sup>a</sup>	0,07±0,003 <sup>b</sup>	0,16±0,07 <sup>b</sup>
CPyrCl	0,025	1,43±0,03 <sup>d</sup>	0,05±0,001 <sup>c</sup>	0,14±0,01 <sup>c</sup>
	0,05	2,37±0,06 <sup>c</sup>	0,01±0,001 <sup>d</sup>	0,08±0,001 <sup>d</sup>
	0,10	3,56±0,01 <sup>a</sup>	0,13±0,01 <sup>a</sup>	0,41±0,01 <sup>a</sup>
	0,20	2,96±0,05 <sup>b</sup>	0,11±0,01 <sup>b</sup>	0,33±0,01 <sup>b</sup>

Em cada coluna, letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.4:** Efeito da concentração de solvente sobre a eficiência de extração de compostos fenólicos.

### 3.4. Efeito do tempo de extração

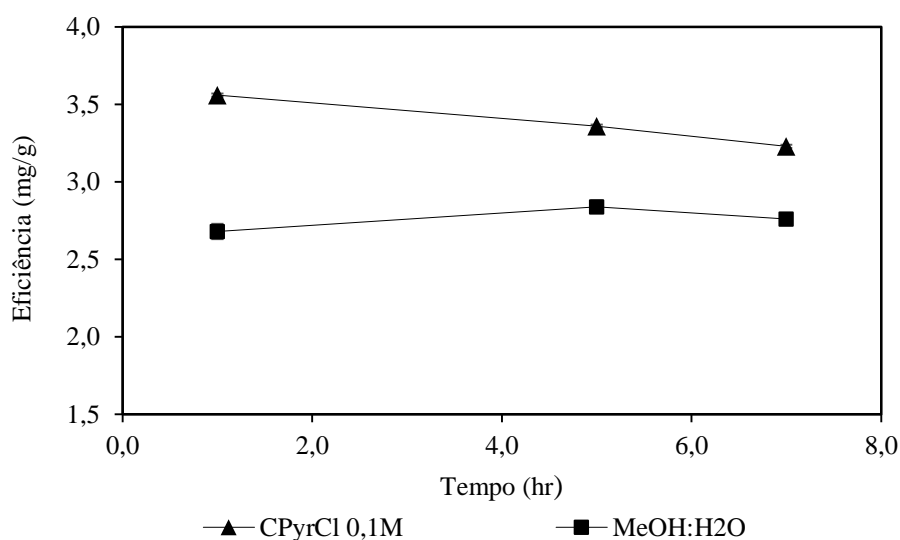
De forma a otimizar a eficiência, variou-se o parâmetro tempo de extração utilizando as seguintes condições base: extração de 300 mg de amostra utilizando 10 ml de CPyrCl (0,1 M) e MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20%, v/v) durante 1, 5 e 7 horas.

Os resultados mostrados na Figura 3.5 e na Tabela 3.5 indicam claramente que, para o solvente misto metanol/água, a eficiência de extração é a mesma ao longo do tempo, não havendo diferenças significativas entre os resultados entre 1 e 7 horas. No caso do CPyrCl, após a primeira hora, a eficiência de extração vai diminuindo um pouco ao longo do tempo.

**Tabela 3.5:** Quantificação de compostos fenólicos após diferentes tempos de extração.

Solvente	Tempo de extração (h)	Eficiência de extração (média ± DP, mg/g)		
		quercetina 3- <i>O</i> -rutinósido	canferol 3- <i>O</i> -rutinósido	isoramnetina 3- <i>O</i> -rutinósido
MeOH:H <sub>2</sub> O (80:20, v/v)	1	2,68±0,05 <sup>a</sup>	0,09±0,001 <sup>a</sup>	0,46±0,03 <sup>a</sup>
	5	2,84±0,04 <sup>a</sup>	0,09±0,001 <sup>a</sup>	0,49±0,01 <sup>a</sup>
	7	2,76±0,01 <sup>a</sup>	0,09±0,001 <sup>a</sup>	0,48±0,02 <sup>a</sup>
CPyrCl (0,1 M)	1	3,56±0,01 <sup>a</sup>	0,13±0,01 <sup>a</sup>	0,41±0,01 <sup>a</sup>
	5	3,36±0,01 <sup>b</sup>	0,11±0,01 <sup>b</sup>	0,40±0,01 <sup>b</sup>
	7	3,23±0,01 <sup>c</sup>	0,12±0,01 <sup>c</sup>	0,38±0,01 <sup>c</sup>

Para cada extrato e em cada coluna, letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

**Figura 3.5:** Efeito do tempo sobre a eficiência de extração de compostos fenólicos.

Assim, 1 hora foi determinada como tempo de extração ótimo.

### 3.5. Validação do método de extração

As características do método analítico para análise de compostos fenólicos utilizando o líquido iônico CPyrCl foram avaliadas pela determinação da linearidade e limites de detecção e de quantificação (Tabela 3.6).

Depois de estudar a linearidade (11 - níveis), preparou-se uma curva de calibração de 9-níveis utilizando a razão de pico/área versus concentração do padrão ( $\mu\text{g/ml}$ ). Utilizou-se a média das determinações em triplicado para cada nível. A validação do método foi realizada utilizando quercetina-3-*O*-rutinósido e canferol 3-*O*-rutinósido, obtendo-se um coeficiente de correlação para ambos os compostos de 0,999. O limite de detecção (LOD),

calculado como a concentração correspondente a três vezes o desvio padrão da curva de calibração, dividida pelo declive, foi de 2,19 e 1,05 µg/ml, respetivamente. O limite de quantificação (LOQ) foi calculado utilizando a concentração correspondente a dez vezes o erro de calibração, dividida pelo declive, e foi de 6,65 e 3,20 µg/ml, respetivamente.

**Tabela 3.6:** Características analíticas de padrões fenólicos utilizados no método de análise.

		<b>Quercetina 3-O- rutinósido</b>	<b>Canferol 3-O- rutinósido</b>
<b>R<sub>t</sub> (tempo de retenção)</b>	<b>média</b>	19,9	21,3
	<b>CV, % (n=18)</b>	0,07	0,07
<b>Coefficiente de correlação (r<sup>2</sup>)</b>		0,999	0,999
<b>Lineariedade (µg/ml)</b>		0,625 - 100	0,625 - 40
<b>Limites</b>	<b>LOD (µg/ml)</b>	2,19	1,05
	<b>LOQ (µg/ml)</b>	6,65	3,20
<b>Precisão CV, % (n=7)</b>		0,38	-
<b>Repetibilidade CV, % (n=9)</b>		1,17	-
<b>Reprodutibilidade (Recuperação, %)</b>		97,62	-

Para avaliar os restantes parâmetros de validação utilizou-se unicamente o composto quercetina 3-O-rutinósido, por ser o principal composto fenólico presente nas amostras analisadas. De forma a avaliar a precisão instrumental, o extrato da amostra (*A. acutifolius*) foi injetado sete vezes, ao longo do mesmo dia. O método cromatográfico provou ser preciso (CV% 0,38, Tabela 3.6). A repetibilidade da extração foi avaliada mediante a aplicação do procedimento de extração, três vezes para a mesma amostra. O valor CV obtido foi baixo (1,17%, Tabela 3.6). A reprodutibilidade do método de extração foi avaliada pelo procedimento de adição de padrão (percentagem de recuperação). A quercetina-3-O-rutinósido foi adicionada às amostras em três níveis de concentração (10, 25 e 50% do pico de concentração/área, cada um em triplicado), antes da extração. O método apresentou bons valores de recuperação, com percentuais médios de 97,62%.

### 3.6. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante da amostra (*A. acutifolius*) em estudo foi avaliada através de três métodos: efeito captador de radicais livres (DPPH), poder redutor e inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno.

Na Tabela 3.7, apresentam-se os resultados obtidos nos diferentes ensaios, expressos em  $EC_{50}$  (concentração de amostra necessária para provocar 50% da atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor).

Analisando a Tabela 3.7 é possível verificar que os valores de  $EC_{50}$  obtidos com CPyrCl (0,1 M) são mais altos, logo indicam uma menor atividade antioxidante, comparativamente com a utilização de MeOH:H<sub>2</sub>O.

**Tabela 3.7:** Resultados obtidos da atividade antioxidante para o CPyrCl (0,1 M) e MeOH:H<sub>2</sub>O.

	CPyrCl (0,1 M)	MeOH:H <sub>2</sub> O	Valor de <i>p</i> teste <i>t</i> -Student
Efeito captador de radicais livres (DPPH)	9,14±0,28	3,77±0,97	<0,001
Poder redutor	12,63±0,67	2,11±0,03	<0,001
Inibição da descoloração do $\beta$ -caroteno	10,11±0,35	1,38±0,08	<0,001

Valores de  $EC_{50}$  para o Trolox (controlo positivo): 42  $\mu$ g/ml (atividade captadora DPPH), 41  $\mu$ g/ml (poder redutor) e 18  $\mu$ g/ml (inibição da descoloração  $\beta$ -caroteno).

É importante referir que se encontraram algumas dificuldades experimentais na implementação dos métodos de *screening* da atividade antioxidante dos extratos das soluções aquosas contendo surfactantes, devido à precipitação de alguns compostos. Provavelmente os métodos utilizados não foram otimizados para este tipo de solventes. De facto, os reagentes utilizados nestes métodos estão dissolvidos em água ou metanol, podendo comprometer a eficiência da utilização de outros solventes no extrato.



## Capítulo 4. Conclusões e trabalho futuro

Numa primeira fase, foram estudadas soluções aquosas de cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio e cloreto de tetrametilamónio obtendo-se para o LI C<sub>4</sub>mimCl (concentração de 1,5 M) resultados muito satisfatórios, com eficiência de extração superior à obtida utilizando métodos convencionais.

Posteriormente, foram estudadas soluções aquosas de cloreto de cetilpiridínio, brometo de miristiltrimetilamónio e, também, de dois surfactantes não iónicos (Triton X-100 e Genapol X-080) e um surfactante aniónico, dodecil sulfato de sódio.

Neste trabalho, demonstrou-se que este tipo de solventes apresentam capacidade de manter ou superar o desempenho dos solventes convencionais, sendo que o CPyrCl apresentou uma maior eficiência de extração, à temperatura ambiente, com razão sólido-líquido 30:1 (mg/ml), com concentração 0,1 M durante 1 h de extração. Nestas condições ótimas, o rendimento de quercetina, canferol e isoramnetina foram de  $3,56 \pm 0,01$ ,  $0,13 \pm 0,01$  e  $0,41 \pm 0,01$  mg/g, respetivamente. Comparando com o método convencional, o CPyrCl em condições ótimas apresenta uma eficiência significativamente maior para a quercetina 3-*O*-rutinósido e isoramnetina 3-*O*-rutinósido, no entanto para a canferol 3-*O*-rutinósido não apresentou diferenças significativas.

Numa segunda etapa fez-se o estudo da atividade antioxidante, verificando-se, que nas condições de máxima eficiência de extração, os valores de EC<sub>50</sub> do extrato revelaram menor atividade antioxidante comparativamente com o resultado da extração hidrometanólica, provavelmente devido ao facto dos métodos utilizados na avaliação *in vitro* da atividade antioxidante não estarem otimizados para este tipo de solventes (salienta-se o facto de todos os reagentes utilizados nos métodos de *screening* do potencial antioxidante serem dissolvidos em água ou metanol, o que pode comprometer a eficiência da utilização simultânea de outros solventes).

### **Trabalho Futuro**

Dando seguimento a este trabalho, propõe-se como atividades futuras estudar a eficiência de extração de compostos fenólicos, utilizando diferentes líquidos iónicos e fazendo variar o número de átomos de carbono da cadeia alquilo.

Será interessante ainda estender o estudo de aplicação de novos solventes utilizando outros métodos de extração (micro-ondas, ultrassons, etc.), otimizando os diversos parâmetros de extração com recurso a metodologias de planeamento de experiências. Seria também de grande interesse o estudo de formas de recuperação dos compostos fenólicos a partir do extrato obtido bem como a otimização de métodos de avaliação do potencial antioxidante utilizando este tipo alternativo de solventes. Por fim, o estudo de novos líquidos iónicos ou de solventes eutéticos de origem natural e de menor toxicidade será um passo importante também na área de extração de compostos bioativos de matrizes vegetais.

## Referências bibliográficas

Alam, M. N., N. J. Bristi e M. Rafiquzzaman (2013). "Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity." *Saudi Pharmaceutical Journal* **21**(2): 143-152.

Amarowicz, R., R. B. Pegg, P. Rahimi-Moghaddam, B. Barl e J. A. Weil (2004). "Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies." *Food Chemistry* **84**(4): 551-562.

Barros, L., M. Duenas, A. M. Carvalho, I. C. Ferreira e C. Santos-Buelga (2011). "Use of HPLC–DAD–ESI/MS to profile phenolic compounds in edible wild greens from Portugal." *Food Chemical Toxicol* **127**: 169-173.

Block, P. "Ficha de Produto-Triton X-100." Disponível em: <http://www.scbt.com/pt/datasheet-29112-Triton-X-100.html>, Consultado em: 18 de junho de 2015.

Book, C. "Ficha de produto-Genapol® X-080." Disponível em: [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_US\\_CB9405938.aspx](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_US_CB9405938.aspx), Consultado em: 18 de junho de 2015.

Braga, M. E. M., I. J. Seabra, A. M. A. Dias e H. C. de Sousa (2013). CHAPTER 7 Recent Trends and Perspectives for the Extraction of Natural Products. *Natural Product Extraction: Principles and Applications*. Cambridge, UK, The Royal Society of Chemistry: 231-284.

Carocho, M. e I. C. F. R. Ferreira (2013). "A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives." *Food and Chemical Toxicology* **51**: 15-25.

Chang, Q. Y., N. S. Tan, W. H. J. Yong e L. Ge (2011). "Surfactant-assisted pressurized liquid extraction for determination of flavonoids from *Costus speciosus* by micellar electrokinetic chromatography." *Journal of Separation Science* **34**: 462-468.

Chatterjee, A., S. P. Moulik, S. K. Sanyal, B. K. Mishra e P. M. Puri (2001). "Thermodynamics of micelle formation of ionic surfactants: A critical assessment for sodium dodecyl sulfate, cetyl pyridinium chloride and dioctyl sulfosuccinate (Na salt) by microcalorimetric, conductometric, and tensiometric measurements." *Journal of Physical Chemistry B* **105**(51): 12823-12831.

Chowdhury, S. A., R. Vijayaraghavan e D. R. MacFarlane (2010). "Distillable ionic liquid extraction of tannins from plant materials." *Green Chemistry* **12**(6): 1023-1028.

## Referências bibliográficas

---

Claudio, A. F. M., M. C. Neves, K. Shimizu, J. N. Canongia Lopes, M. G. Freire e J. A. P. Coutinho (2015). "The magic of aqueous solutions of ionic liquids: ionic liquids as a powerful class of catanionic hydrotropes." *Green Chemistry, in press*.

Dai, J. e R. J. Mumper (2010). "Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties." *Molecules* **15**(10): 7313-7352.

Dai, Y., R. Verpoorte e Y. H. Choi (2014). "Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*)." *Food Chemistry* **159**: 116-121.

Dai, Y., G.-J. Witkamp, R. Verpoorte e Y. H. Choi (2013). "Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus tinctorius* L." *Analytical Chemistry* **85**(13): 6272-6278.

Du, F. Y., X. H. Xiao, X. J. Luo e G. K. Li (2009). "Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds from medicinal plants." *Talanta* **78**(3): 1177-1184.

Fang, Y. Z., S. Yang e G. Y. Wu (2002). "Free radicals, antioxidants, and nutrition." *Nutrition* **18**(10): 872-879.

Gawlik-Dziki, U., M. Swieca, M. Sulkowski, D. Dziki, B. Baraniak e J. Czyz (2013). "Antioxidant and anticancer activities of *Chenopodium quinoa* leaves extracts - In vitro study." *Food and Chemical Toxicology* **57**: 154-160.

Heleno, S. A., L. Barros, M. J. Sousa, A. Martins e I. C. F. R. Ferreira (2010). "Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity." *Food Chemistry* **119**(4): 1443-1450.

Hough-Troutman, W. L., M. Smiglak, S. Griffin, W. M. Reichert, I. Mirska, J. Jodynis-Liebert, T. Adamska, J. Nawrot, M. Stasiewicz, R. D. Rogers e J. Pernak (2009). "Ionic liquids with dual biological function: sweet and anti-microbial, hydrophobic quaternary ammonium-based salts." *New Journal of Chemistry* **33**(1): 26-33.

Joshi, M., D. e J. Anderson, L. (2012). "Recent advances of ionic liquids in separation science and mass spectrometry." *RSC Advances* **2**: 5470-5484.

Jungnickel, C., J. Luczak, J. Ranke, J. F. Fernandez, A. Muller e J. Thoming (2008). "Micelle formation of imidazolium ionic liquids in aqueous solution." *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **316**(1-3): 278-284.

Martins, D., L. Barros, A. M. Carvalho e I. C. F. R. Ferreira (2011). "Nutritional and in vitro antioxidant properties of edible wild greens in Iberian Peninsula traditional diet." *Food Chemistry* **125**(2): 488-494.

Memon, A. A., N. Memon e M. I. Bhangar (2010). "Micelle-mediated extraction of chlorogenic acid from *Morus laevigata* W. leaves." *Separation and Purification Technology* **76**(2): 179-183.

Merkh, G., R. Pfaff e H. D. Isengard (2012). "Capabilities of automated Karl Fischer titration combined with gas extraction for water determination in selected dairy products." *Food Chemistry* **132**(4): 1736-1740.

Morales, P., A. M. Carvalho, M. C. Sanchez-Mata, M. Camara, M. Molina e I. C. F. R. Ferreira (2012). "Tocopherol composition and antioxidant activity of Spanish wild vegetables." *Genetic Resources and Crop Evolution* **59**(5): 851-863.

Passos, H., M. G. Freire e J. A. Coutinho (2014). "Ionic liquid solutions as extractive solvents for value-added compounds from biomass." *Green Chemistry* **16**(12): 4786-4815.

Pereira, C., L. Barros, A. M. Carvalho e I. C. F. R. Ferreira (2013). "Use of UFLC-PDA for the Analysis of Organic Acids in Thirty-Five Species of Food and Medicinal Plants." *Food Analytical Methods* **6**(5): 1337-1344.

Pinho, E., I. C. F. R. Ferreira, L. Barros, A. M. Carvalho, G. Soares e M. Henriques (2014). "Antibacterial Potential of Northeastern Portugal Wild Plant Extracts and Respective Phenolic Compounds." *Biomed Research International*: 1-8.

Reis, F. S., S. A. Heleno, L. Barros, M. J. Sousa, A. Martins, C. Santos-Buelga e I. C. F. R. Ferreira (2011). "Toward the Antioxidant and Chemical Characterization of Mycorrhizal Mushrooms from Northeast Portugal." *Journal of Food Science* **76**(6): C824-C830.

Rinaldi, R., C. Garcia, L. L. Marciniuk, V. A. Rossi e U. Schuchardt (2007). "Síntese de biodiesel: Uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral." *Química. Nova* **30**(5): 1374-1380.

Ruiz, C. C., L. Diaz-Lopez e J. Aguiar (2007). "Self-assembly of tetradecyltrimethylammonium bromide in glycerol aqueous mixtures: A thermodynamic and structural study." *Journal of Colloid and Interface Science* **305**(2): 293-300.

Sigma-Aldrich. "Ficha de Produto-1-Butyl-3-methylimidazolium chloride." Disponível em: [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/04129?lang=pt&region=PT&gclid=CjwKEAjw2ImsBRCnjq70n\\_amv14SJACHXijN-htRuAZGQl\\_WZv9l60GnhfHpGf2EIMWkB5cRhX1VwBoC5LDw\\_wcB](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/04129?lang=pt&region=PT&gclid=CjwKEAjw2ImsBRCnjq70n_amv14SJACHXijN-htRuAZGQl_WZv9l60GnhfHpGf2EIMWkB5cRhX1VwBoC5LDw_wcB), Consultado em: 18 de junho de 2015.

Sigma-Aldrich. "Ficha de Produto-Genapol® X-080." Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/48750?lang=pt&region=PT>, Consultado em: 18 de junho de 2015.

Sigma-Aldrich. "Ficha de Produto-Myristyltrimethylammonium bromide." Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t4762?lang=pt&region=PT>, Consultado em: 18 de junho de 2015.

## Referências bibliográficas

---

Sigma-Aldrich. "Ficha de Produto-Sodium dodecyl sulfate." Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/16026?lang=pt&region=PT>, Consultado em: 18 de junho de 2015.

Sigma-Aldrich. "Ficha de Produto-Tetramethylammonium chloride." Disponível em: [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/t19526?lang=pt&region=PT&gclid=CjwKEAjw2ImsBRCnjq70n\\_amv14SJACHXijNmkVxetz6jiIdI8pDdyrtN6lSxXEj3Hm3TQS7K4\\_VRoCEJbw\\_wcB](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/t19526?lang=pt&region=PT&gclid=CjwKEAjw2ImsBRCnjq70n_amv14SJACHXijNmkVxetz6jiIdI8pDdyrtN6lSxXEj3Hm3TQS7K4_VRoCEJbw_wcB), Consultado em: 18 de junho de 2015.

Sigma-Aldrich. "Ficha de produto-Triton<sup>TM</sup> X-100." Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t8787?lang=pt&region=PT>, Consultado em: 18 de junho de 2015.

Sun, C. e H. Z. Liu (2008). "Application of non-ionic surfactant in the microwave-assisted extraction of alkaloids from *Rhizoma Coptidis*." *Analytica Chimica Acta* **612**(2): 160-164.

Sun, Y. S., W. Li e J. H. Wang (2011). "Ionic liquid based ultrasonic assisted extraction of isoflavones from *Iris tectorum Maxim* and subsequently separation and purification by high-speed counter-current chromatography." *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **879**(13-14): 975-980.

Valle, L. G. (2011). "Oxidative stress in aging: Theoretical outcomes and clinical evidences in humans." *Biomedicine & Aging Pathology* **1**: 1-7.

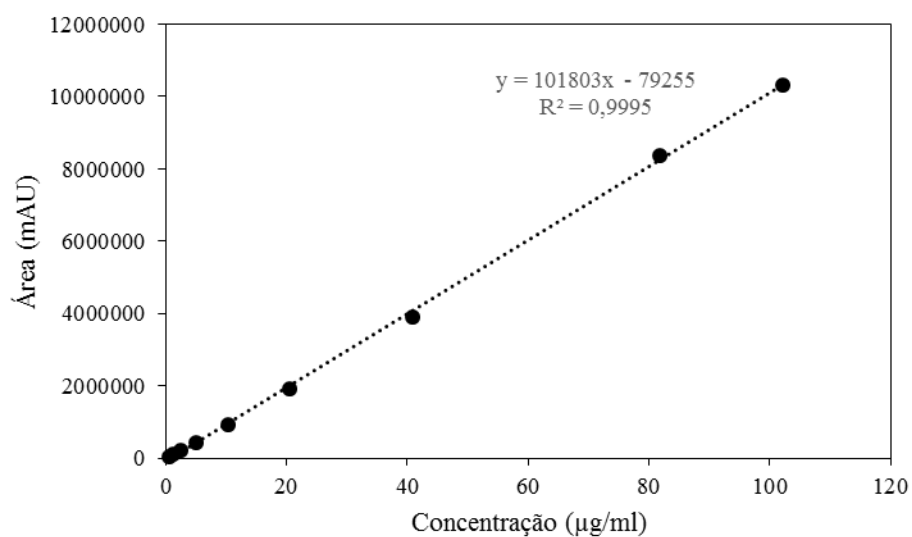
Xu, W., K. Chu, H. Li, Y. Zhang, H. Zheng, R. Chen e L. Chen (2012). "Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of flavonoids from *Bauhinia championii* (Benth.) Benth." *Molecules* **17**(12): 14323-14335.

Zahra, R., M. Mehrnaz, V. Farzaneh e S. Kohzad (2007). "Antioxidant activity of extract from a brown alga, *Sargassum boveanum*." *African Journal of Biotechnology* **6**(24): 2740-2745.

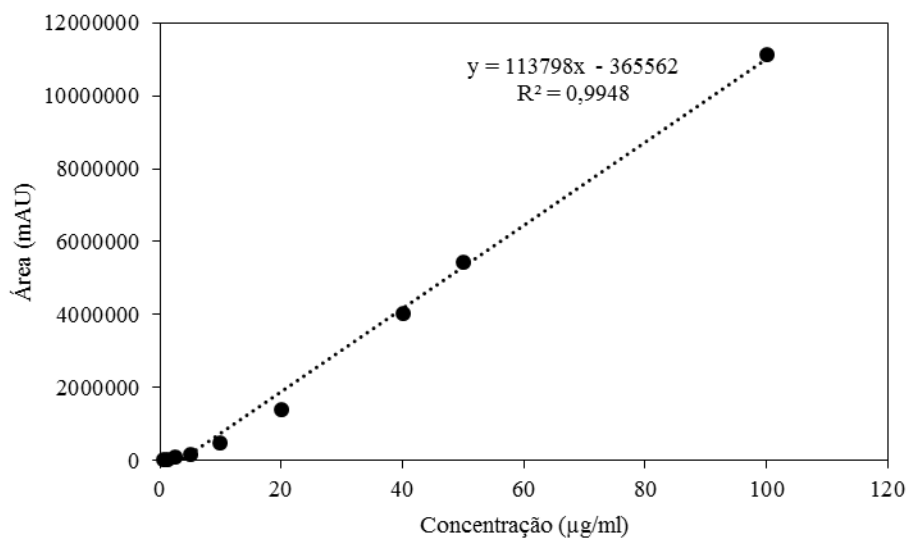
Zeng, H., Y. Wang, J. Kong, C. Nie e Y. Yuan (2010). "Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of rutin from Chinese medicinal plants." *Talanta* **83**(2): 582-590.

Zhou, Y., D. Wu, P. Cai, G. Cheng, C. Huang e Y. Pan (2015). "Special Effect of Ionic Liquids on the Extraction of Flavonoid Glycosides from *Chrysanthemum morifolium Ramat* by Microwave Assistance." *Molecules* **20**(5): 7683.

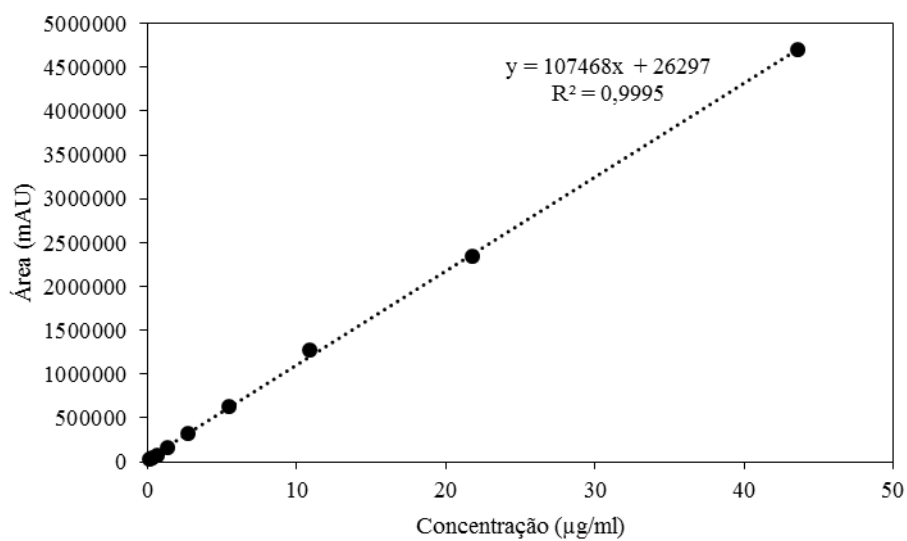
## Anexo A. Retas de Calibração



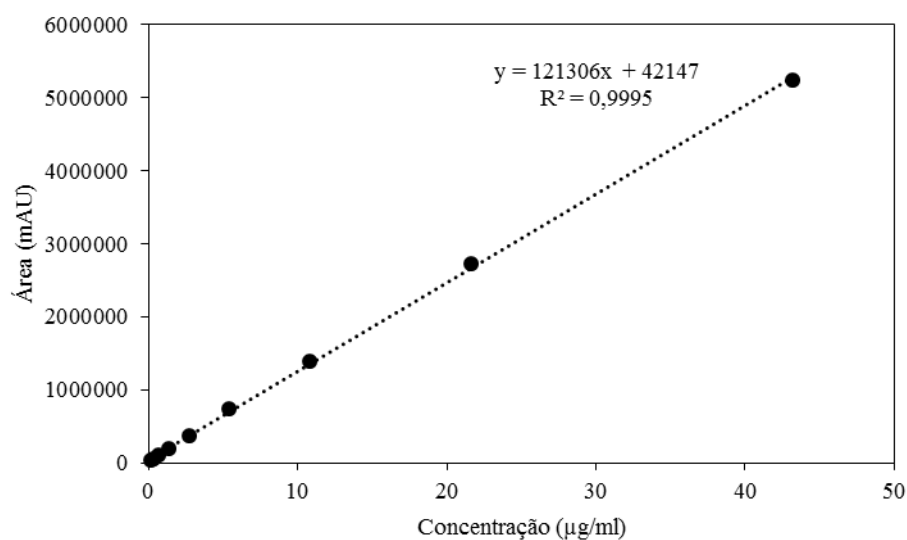
**Figura A.1:** Reta de calibração da quercetina 3-O-rutinósido em CPyrCl (0.1M).



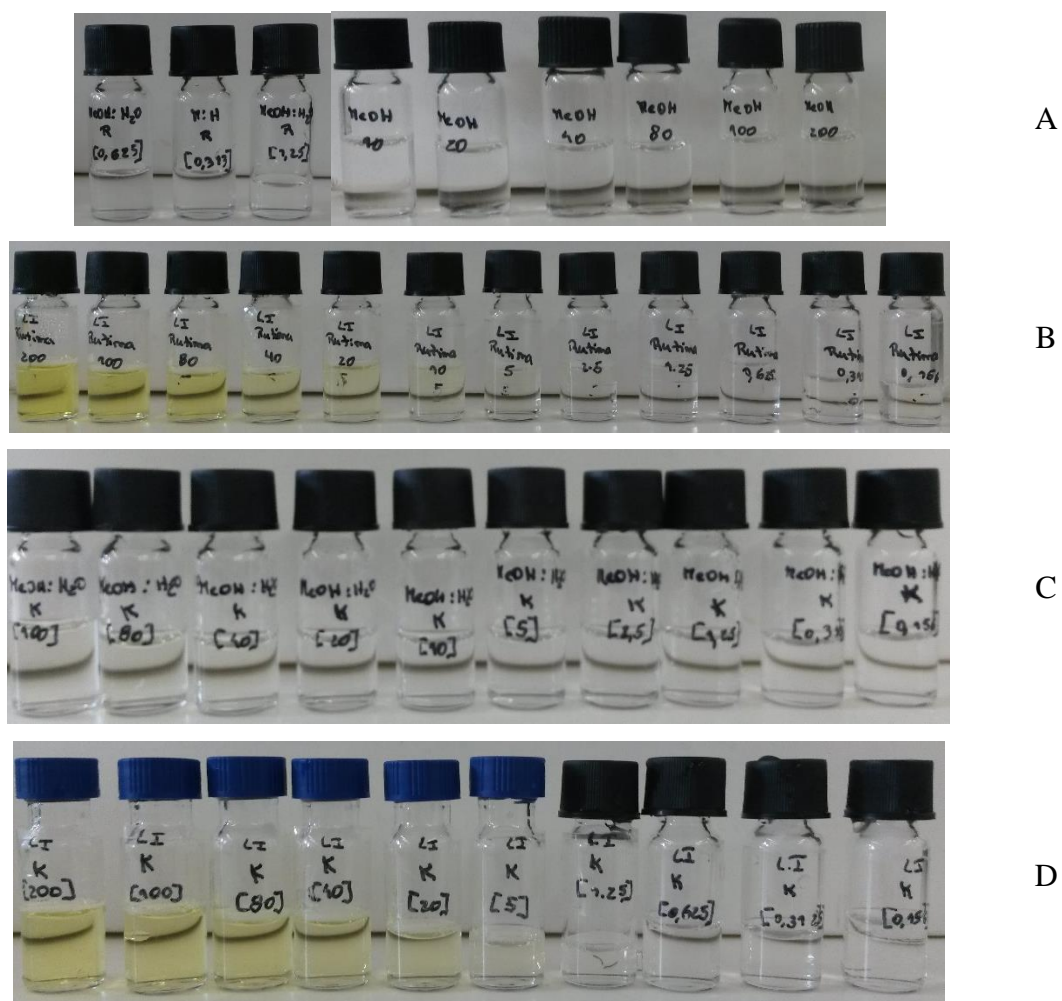
**Figura A.2:** Reta de calibração da quercetina 3-O-rutinósido em MeOH:H<sub>2</sub>O.



**Figura A.3:** Retas de calibração de canferol 3-O-rutinósido em CPyrCl (0.1M).



**Figura A.4:** Retas de calibração de canferol 3-O-rutinósido em MeOH:H<sub>2</sub>O.



**Figura A.5:** A e B correspondem às amostras de diferentes concentrações de quercetina 3-*O*-rutinosido em MeOH:H<sub>2</sub>O e CPyrCl (0,1 M), respectivamente. B C e D correspondem às amostras de canferol 3-*O*-rutinosido em em MeOH:H<sub>2</sub>O e CPyrCl (0,1 M), respectivamente.