



# **Extração de compostos bioativos de fontes vegetais utilizando solventes eutéticos**

**Fátima Daniela Ferreira Almeida**

Dissertação apresentada à  
**Escola Superior de Tecnologia e de Gestão**  
**Instituto Politécnico de Bragança**  
para obtenção do Grau de Mestre em  
**Tecnologia Biomédica**

Supervisores:

**Olga Ferreira**

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

**Lillian Barros**

Outubro de 2016



# **Extração de compostos bioativos de fontes vegetais utilizando solventes eutéticos**

**Fátima Daniela Ferreira Almeida**

Dissertação apresentada à  
**Escola Superior de Tecnologia e de Gestão**  
**Instituto Politécnico de Bragança**  
para obtenção do Grau de Mestre em  
**Tecnologia Biomédica**

Supervisores:

**Olga Ferreira**

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

**Lillian Barros**

Outubro de 2016



*“A sabedoria dos homens é proporcional não à sua experiência  
Mas à sua capacidade de adquirir experiência.”*

*George Bernard Sha*

## Agradecimentos

A realização deste projeto só foi possível com o apoio e incentivo que me foi prestado pelos que me rodeiam e à qual estarei eternamente grata. Assim, reconhecendo-o, deixo apenas algumas palavras, com um sentido e profundo sentimento de agradecimento a todos aqueles que me acompanharam ao longo deste percurso.

Um agradecimento à Professora Olga, à Professora Isabel e à Doutora Lillian, por todo o profissionalismo, dedicação, disponibilidade e interesse manifestado em todos os momentos. Pelos conhecimentos que sempre me foram transmitindo, despertando o meu interesse de querer saber, sempre, mais e a vontade constante de querer fazer melhor.

Ao Doutor Miguel Lage, pela ajuda, pela dedicação e empenho que me foi prestado.

Aos meus pais e irmã, à qual dedico este trabalho, por todo o apoio, amor, atenção e força que sempre me proporcionaram. Pelo esforço que fizeram, para que eu conseguisse alcançar esta etapa, por todos os conselhos e valores que sempre me inculcaram. Por acreditarem em mim, pois sem eles nunca teria conseguido chegar até aqui e se o consegui a eles o devo. Obrigada, pelo exemplo de vida que são para mim.

Ao Marco, pela pessoa que é. Por todo o amor, carinho, ajuda, incentivo e compreensão, por ser namorado e o melhor-amigo, por toda a confiança que sempre me depositou e a força transmitida ao longo de todo este trabalho.

Aos meus amigos e familiares, que sempre me acompanharam e estiveram do meu lado em tudo.

Agradeço, igualmente, a toda a equipa do BioChemCore, por me receberem da melhor forma possível, por todos os momentos que me foram proporcionados e pela ajuda, imprescindível, que cada um me dispensou.

A todos, o meu sincero Obrigada!



# Índice geral

<i>Agradecimentos</i>	<i>ii</i>
<i>Índice geral</i>	<i>iv</i>
<i>Índice de figuras</i>	<i>vi</i>
<i>Índice de tabelas</i>	<i>vii</i>
<i>Lista de abreviaturas</i>	<i>viii</i>
<i>Resumo</i>	<i>x</i>
<i>Abstract</i>	<i>xii</i>
<b>Capítulo 1. Introdução</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Enquadramento e objetivos deste trabalho</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Estrutura da dissertação</b>	<b>2</b>
<b>1.3. Extração de produtos naturais</b>	<b>2</b>
1.3.1. Solventes não convencionais	2
1.3.2. Propriedades físicas dos solventes utilizados neste trabalho	4
1.3.3. Exemplos de aplicação	4
<b>1.4. Atividade antioxidante</b>	<b>12</b>
1.4.1. Poder redutor	13
1.4.2. Atividade captadora de radicais – DPPH	13
1.4.3. Inibição da descoloração do $\beta$ -caroteno	14
1.4.4. Inibição da peroxidação lipídica	14
<b>1.5. Avaliação da hepatotoxicidade dos extratos</b>	<b>15</b>
<b>Capítulo 2. Materiais e métodos</b>	<b>16</b>
<b>2.1. Preparação de solventes eutéticos para os ensaios de extração</b>	<b>16</b>
2.1.1. Materiais	16
2.1.2. Preparação dos solventes eutéticos	17
2.1.3. Titulação por Karl-Fisher	17
<b>2.2. Preparação de amostras</b>	<b>17</b>
<b>2.3. Extração por maceração</b>	<b>18</b>
<b>2.4. Análise quantitativa da rutina por espectrofotometria UV-Vis</b>	<b>18</b>
<b>2.5. Análise quantitativa da rutina por HPLC-DAD</b>	<b>19</b>

<b>2.6. Otimização do processo de extração utilizando a metodologia de superfície de resposta</b>	<b>20</b>
2.6.1. Planeamento experimental	21
2.6.2. Modelo matemático	22
2.6.3. Procedimento simplex de otimização das variáveis para uma resposta máxima	23
<b>2.7. Análise da dose-resposta da razão sólido/líquido</b>	<b>23</b>
<b>2.8. Análise estatística</b>	<b>24</b>
<b>2.9. Avaliação da atividade antioxidante nas condições ótimas de extração de rutina</b>	<b>25</b>
2.9.1. Preparação da amostra	25
2.9.2. Métodos para avaliação da atividade antioxidante	26
2.9.2.1. Poder redutor	26
2.9.2.2. Atividade captadora de radicais – DPPH	26
2.9.2.3. Inibição da descoloração do $\beta$ -caroteno	26
2.9.2.4. Inibição da peroxidação lipídica	27
2.9.3. Análise estatística dos ensaios de avaliação da atividade antioxidante	27
<b>2.10. Citotoxicidade</b>	<b>27</b>
<b>Capítulo 3. Resultados e discussão</b>	<b>28</b>
<b>3.1. Extração convencional</b>	<b>28</b>
<b>3.2. Extração não convencional</b>	<b>29</b>
3.2.1. Seleção do solvente mais apropriado	29
3.2.2. Otimização do processo de extração e verificação experimental da previsão dos resultados do modelo	31
3.2.2.1. RSM baseada no CCCD com três variáveis	32
3.2.2.2. RSM baseado em FFD com as variáveis t e T.	36
3.2.2.3. Condições numéricas ótimas que maximizam a extração e análise estatística	37
3.2.3. Análise da dose-resposta da razão sólido/líquido nas condições ótimas de t, T e S.	38
<b>3.3. Avaliação da bioatividade e toxicidade</b>	<b>40</b>
3.3.1. Atividade antioxidante	40
3.3.2. Hepatotoxicidade	41
<b>Capítulo 4. Conclusões e trabalho futuro</b>	<b>42</b>
<b>Referências bibliográficas</b>	<b>44</b>
<b>Anexo A. Propriedades físicas dos solventes</b>	<b>51</b>
<b>Anexo B. Retas de calibração</b>	<b>53</b>
<b>Anexo C. Descrição da metodologia matemática do planeamento experimental</b>	<b>54</b>

# Índice de figuras

<i>Figura 1.1 Estruturas químicas dos três compostos fenólicos identificados em A. acutifolius.....</i>	<i>1</i>
<i>Figura 1.2. Diagrama de fases sólido-líquido, com formação de um ponto eutético. ....</i>	<i>2</i>
<i>Figura 1.3. Representação de um processo de extração utilizando um solvente eutético.....</i>	<i>3</i>
<i>Figura 2.1. Representação esquemática do processo de extração: A) Junção do solvente + planta; B) Processo de extração, no banho a 30 °C, através de placas de agitação; C) Amostras de soluções do extrato para análise por UV-Vis. ....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 2.2. Espectrofotômetro (UV-Vis) da marca SPECORD 200 usado neste trabalho. ....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 2.3. Equipamento HPLC-DAD.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 2.4. Sequência esquemática do trabalho de otimização das condições de extração da rotina. ....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 2.5. Fotografia das soluções diluídas utilizadas no estudo da atividade antioxidante. ....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 3.1. Perfil de compostos fenólicos de A. acutifolius, registado a 370 nm, utilizando metanol:água (80:20%, v/v) como solvente. Pico 1: 3-O-rutinósido de quercetina. ....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 3.2. Mostra os resultados dos gráficos e a análise estatística do comportamento da extração de rutina para a abordagem CCCD e FFD em relação à razão S/L de 30 g/L.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 3.3. Parte A: Mostra as respostas interativas 2D individuais para cada variável quando a razão S/L é 30 g/L. A linha representa a resposta da variável quando as outras estão posicionadas nas condições ótimas encontradas (5,54 mg/g dw, t=85 min, T=75 °C e S=100 %). Os pontos (⊙) apresentados junto de cada linha destacam a localização do valor ótimo. A linha mais grossa mostra o padrão de tempo (t), a linha pontilhada o padrão de temperatura (T) e a fina o padrão da proporção solvente (S). As linhas e os pontos são gerados pela combinação dos modelos polinomiais de segunda ordem das Eqs.[14] e [15]. Os valores de ajuste paramétricos obtidos são apresentados na Tabela 3.3. Parte B: A Figura 3.3B1 mostra a dose de resposta da razão S/L (X<sub>4</sub>) para os valores ótimos das outras três variáveis (t=85 min, T=75 °C d S=100 %). Os pontos (○) representam os resultados experimentais obtidos (Tabela 3.4), enquanto a linha mostra o padrão previsto pelo modelo teórico da Eq.[16] (no anexo C). O valor limite (~175 g/L) mostra a concentração máxima experimental alcançável até que a amostra não possa ser fisicamente agitada à escala laboratorial. A Tabela 3.3B2 mostra os padrões previstos da análise da razão S/L efetuada pela Eq.[11] numa escala maior do que a testada experimentalmente. Os pontos (●) destacam as determinações paramétricas.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura B.1. Retas de calibração do 3-O-rutinósido de quercetina em MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) para UV-vis.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura B.2 Retas de calibração do 3-O-rutinósido de quercetina em MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) para HPLC. ....</i>	<i>53</i>

# Índice de tabelas

<i>Tabela 1.1. Revisão bibliográfica sobre extração de rutina de fontes vegetais, utilizando líquidos iônicos.....</i>	<i>5</i>
<i>Tabela 1.2. Revisão bibliográfica sobre extração de flavonóis utilizando solventes eutéticos, diferentes técnicas e condições de extração. ....</i>	<i>8</i>
<i>Tabela 1.3. Revisão bibliográfica sobre a extração de outros compostos fenólicos utilizando solventes eutéticos, diferentes técnicas e condições de extração.....</i>	<i>11</i>
<i>Tabela 2.1. Origem, pureza e ponto de fusão dos solventes utilizados. ....</i>	<i>16</i>
<i>Tabela 2.2. Domínio experimental e codificação das variáveis independentes das abordagens CCCD e FFD. .</i>	<i>22</i>
<i>Tabela 2.3. Análise da variável razão S/L para a detecção do ponto de saturação da extração da rutina nas condições ótimas encontradas, previamente analisadas por RSM. ....</i>	<i>24</i>
<i>Tabela 3.1. Rendimento (Média ± DP) obtido na etapa inicial de seleção do solvente mais adequado para a extração de rutina. ....</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 3.2. A parte A exhibe os resultados RSM da CCCD para a primeira abordagem na otimização das três variáveis principais envolvidas (X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> e X<sub>3</sub>). A parte B mostra os resultados RSM do FFD para a otimização das duas variáveis (X<sub>1</sub> e X<sub>2</sub>) de extração envolvidas (variáveis, valores naturais e intervalos). Foram realizadas três repetições (r<sub>1-3</sub>) para cada condição.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabela 3.3 Resultados paramétricos da equação polinomial de segunda ordem (Eq.[10]) de acordo com CCCD com 5 níveis de intervalo (parte A) e FFD com 3 níveis de intervalo (parte B). Os subscritos paramétricos 1, 2 e 3 são os das variáveis envolvidas t, T e S, respectivamente. A análise de significância dos parâmetros (α=0,05) é apresentada em valores naturais. Além disso, apresenta-se a informação estatística do procedimento de ajuste do modelo.....</i>	<i>34</i>
<i>Tabela 3.4. Valores de extração de rutina em função da razão sólido-líquido (X<sub>4</sub>, razão S/L) nas condições ótimas de tempo (X<sub>1</sub>, t=85 min), temperatura (X<sub>2</sub>, T=75 °C) e proporção de solvente (X<sub>3</sub>, S=100 %). Foram efetuadas três repetições (r<sub>1-3</sub>) para cada condição.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabela 3.5. Resultados obtidos da atividade antioxidante (valores de EC<sub>50</sub> em mg/mL) para 1,2-propanodiol e MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20, v/v).....</i>	<i>40</i>
<i>Tabela A.1. Viscosidade de alguns dos solventes utilizados neste trabalho. ....</i>	<i>51</i>
<i>Tabela A.2. Massa volúmica dos solventes utilizados neste trabalho. ....</i>	<i>51</i>

## Lista de abreviaturas

<b>ANOVA</b>	Análise da tabela de variância
<b>CC</b>	Cloreto de colina
<b>CCCD</b>	Modelo composto central circunscrito
<b>DAD</b>	Detetor de arranjo de díodos
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DES</b>	Solventes eutéticos
<b>DP</b>	Desvio-padrão
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
<b>DW</b>	Estatística Durbin-Watson
<b>EAM</b>	Extração assistida por micro-ondas
<b>EAU</b>	Extração assistida por ultrassons
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder reductor
<b>Eq.</b>	Equação
<b>FFD</b>	Modelo fatorial completo
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>HRF</b>	Extração de calor por refluxo
<b>ILS</b>	Líquidos iônicos
<b>K</b>	Assíntota
<b>m</b>	Dose necessária para 50 % de resposta
<b>MeOH:H<sub>2</sub>O</b>	Metanol:água
<b>MAPE</b>	Erro percentual médio absoluto
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>MSE</b>	Erro médio quadrático
<b>NPCE</b>	Extração por cavitação de pressão negativa.
<b>ns</b>	Não significativo
<b>PLP2:</b>	Cultura de células primárias de fígado de porco
<b>R</b>	Efeito de resposta
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficiente de correlação
<b>R<sup>2</sup><sub>adj</sub></b>	Coefficiente de determinação ajustado
<b>RMSE</b>	<i>Root Mean Square</i>
<b>RSM:</b>	Metodologia de superfície de resposta
<b>Razão S/L</b>	Razão sólido-líquido
<b>S</b>	Proporção de solvente
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SRB</b>	Sulforodamina B
<b>T</b>	Temperatura
<b>t</b>	Tempo de extração
<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico
<b>TBARS</b>	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
<b>Tris</b>	2-Amino-2- (hidroximetil) propano-1,3-diol
<b>Trolox</b>	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico

<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta visível
<b><math>v/v</math></b>	Relação volume/volume
<b><math>w/w</math></b>	Relação massa/massa
<b>2D</b>	Bidimensional
<b>3D</b>	Tridimensional
<b><math>\alpha</math></b>	Declive máximo de resposta
<b><math>v</math></b>	Velocidade máxima
<b><math>\lambda</math></b>	Fase de atraso

## Resumo

Na última década, tem-se intensificado o estudo da utilização de líquidos iônicos e solventes eutécticos em diversos processos de separação e reação, podendo constituir em muitas aplicações, uma alternativa mais favorável aos solventes orgânicos voláteis.

Neste trabalho, pretende-se estudar a aplicação de alguns destes solventes na extração de compostos fenólicos existentes em verduras. Como planta modelo, escolheu-se a espécie *Asparagus acutifolius* L., uma planta comestível, fonte de compostos bioativos nomeadamente 3-*O*-rutinosídeo de quercetina (rutina). Com base na revisão bibliográfica, foram selecionados solventes eutécticos compostos por cloreto de colina (CC) e um álcool (glicerol, etilenoglicol ou 1,2-propanodiol) ou um açúcar (glucose ou sacarose), com o objetivo de obter maiores rendimentos de extração de compostos fenólicos.

Assim, numa primeira fase, foram testadas diversas combinações de solventes, fixando as restantes variáveis (razão sólido-líquido de 30 g/L, tempo de extração de 1 h e temperatura de 30 °C), obtendo-se o melhor rendimento de extração de rutina (4,84 mg/g) com o DES 1,2-propanodiol:CC, contendo 20 % de água, um valor superior ao rendimento obtido com um solvente convencional (metanol:água, 80:20, v/v).

Testou-se ainda a utilização dos álcoois como solventes puros ou com 20 % de água, verificando-se que, nestas condições, a capacidade de extração de alguns álcoois (etileno glicol puro, 1,2-propanodiol + 20 % de água e etileno glicol + 20 % água) foi superior a qualquer um dos DES estudados. O álcool 1,2-propanodiol apresentou os melhores resultados (3,28 mg/g).

Assim, posteriormente, efetuou-se a otimização do processo de extração com 1,2-propanodiol utilizando como variáveis independentes a temperatura, o tempo de extração, a fração mássica de água e a razão sólido-líquido. O rendimento ótimo (5,54 mg rutina/g planta) foi obtido efetuando a extração com 1,2-propanodiol, sem adição de água, à temperatura de 75 °C durante 85 minutos e razão sólido-líquido de 15 g/L. Por fim, o extrato foi caracterizado em termos de perfil fenólico, atividade antioxidante e confirmação de ausência de toxicidade.

Desta forma, concluiu-se que o extrato obtido com o solvente 1,2-propanodiol apresentou menor atividade antioxidante, comparativamente com o solvente metanol:água (80:20, v/v).

Por fim, os resultados da citotoxicidade em células normais revelam que o solvente 1,2-propanodiol (100 %) apresenta toxicidade, pelo que o extrato (dissolvido no solvente) também apresenta. No entanto, se utilizarmos o solvente numa concentração abaixo de 25 % a percentagem de inibição é inferior a 50 %, ou seja, a sua toxicidade é muito inferior.

**Palavras-Chave:** Solventes eutéticos, extração, compostos bioativos.

## Abstract

In the last decade, the study of the use of ionic liquids and deep eutectic solvents in various separation and reaction processes has been intensified, and in many applications, they may constitute a safer alternative to volatile organic solvents.

The main aim of this work is to study the application of some of these solvents in the extraction of phenolic compounds from vegetables. As a model plant, the *Asparagus acutifolius* L. species, an edible plant, was chosen as source of bioactive compounds, especial the phenolic compound quercetin 3-*O*-rutinoside (rutin). Based on the literature review, deep eutectic solvents composed of choline chloride (CC) and an alcohol (glycerol, ethylene glycol or 1,2-propanediol) or a sugar (glucose or sucrose) were selected in order to extract higher extraction yields of phenolic compounds.

In a first stage, various combinations of solvents were screened by setting the remaining variables (solid-liquid ratio of 30 g/L extraction time of 1 h, temperature of 30 °C), and the best extraction yield of rutin (4.84 mg/g) was obtained using 1,2-propanediol:CC with 20 % of water, a value higher than the yield obtained with a conventional solvent (methanol:water, 80:20, v/v).

Furthermore, the use of alcohols as pure solvents or with 20 % of water was also tested, and, under these conditions, the extraction ability of certain alcohols (pure ethylene glycol, 1,2-propanediol + 20 % of water and ethylene glycol + 20 % of water) was superior to any of the DES studied. Moreover, 1,2-propanediol was the alcohol that presented the most promising results (3.84 mg/g).

Thus, thereafter, the optimization of the extraction process was carried out with 1,2-propanediol as solvent using as independent variables the temperature, the extraction time, the water content and the solid-liquid ratio. The optimum yield (5.54 mg rutin/g plant) was obtained by performing the extraction with 1,2-propanediol, without adding water at a temperature of 75 °C for 85 minutes and solid-liquid ratio of 15 g/L. Lastly, the extract was

characterized in terms of phenolic profile, antioxidant activity and confirmation of the absence of toxicity. Hence, it was concluded that the extract obtained with 1,2-propanediol had less antioxidant activity compared with the solvent methanol:water (80:20, v/v).

Finally, the cytotoxicity results in normal cells show that 1,2-propanediol (100 %) presents toxicity, and so does the extract (dissolved in the solvent). However, if we use the solvent in a concentration below 25 %, the percentage of inhibition is less than 50 %, that is, it presented much lower toxicity.

**Keywords:** eutectic solvents, extraction, bioactive compounds.



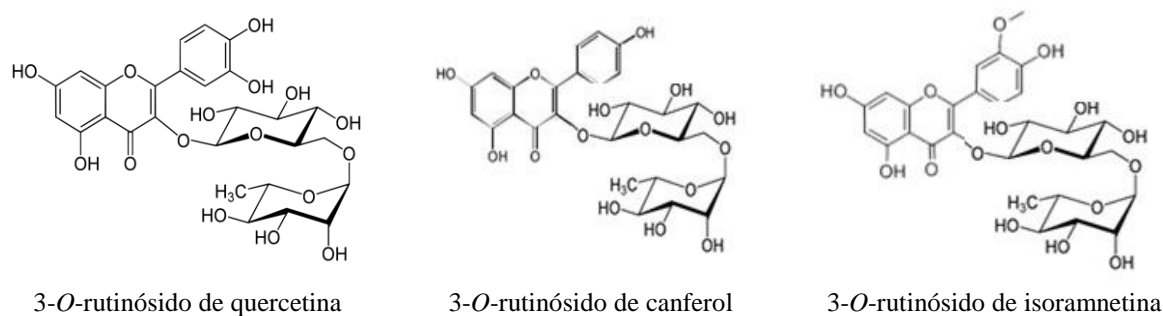
# Capítulo 1. Introdução

## 1.1. Enquadramento e objetivos deste trabalho

Em algumas áreas tradicionais do Mediterrâneo, as verduras silvestres são responsáveis por uma percentagem significativa da ingestão total de antioxidantes na dieta (Barros *et al.* 2011). As plantas comestíveis, nomeadamente as verduras, são também uma fonte de polifenóis bioativos. A espécie *Asparagus acutifolius* L., vulgarmente conhecido como corruda-menor, espargo-bravo-menor ou espargo-silvestre-menor, é um exemplo importante dessas verduras silvestres comestíveis, amplamente consumidas.

Neste último trabalho (Barros *et al.* 2011), efetuou-se uma extração convencional a 30 °C com metanol:água (80:20 %, *v/v*), obtendo-se um perfil fenólico simples com três compostos, representados na Figura 1.1: 3-*O*-rutinosídeo de canferol, 3-*O*-rutinosídeo de isoramnetina e 3-*O*-rutinosídeo de quercetina (rutina), sendo este último o mais abundante.

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 & Mumper 2010). Estes solventes convencionais apresentam diversas desvantagens entre as quais toxicidade, inflamabilidade e volatilidade. Como solventes alternativos para a extração de compostos fenólicos, foram propostos na literatura líquidos iônicos e, mais recentemente, solventes eutécticos (Cui *et al.* 2015).



**Figura 1.1** Estruturas químicas dos três compostos fenólicos identificados em *A. acutifolius*.

Assim, este trabalho tem como principal objetivo estudar a possibilidade de usar solventes eutéticos de origem natural para extrair compostos fenólicos de uma verdura selecionada como matriz modelo, *A. acutifolius*.

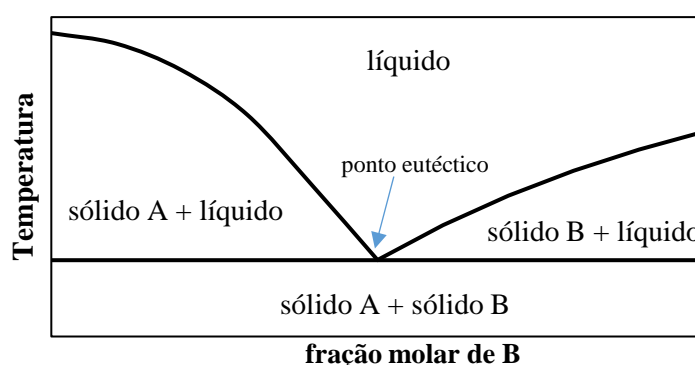
## 1.2. Estrutura da dissertação

Este trabalho encontra-se organizado em quatro capítulos. Este capítulo introdutório inclui uma revisão da literatura sobre a aplicação de solventes eutéticos como solventes de extração de compostos bioativos de plantas bem como uma pequena introdução teórica relativa aos principais métodos utilizados para a avaliação da atividade antioxidante dos extratos, e da hepatotoxicidade no solvente e dos extratos obtidos. No segundo capítulo, descrevem-se as diversas metodologias experimentais aplicadas nas etapas de extração, análise química, avaliação da atividade antioxidante e citotoxicidade. Seguidamente, no capítulo 3, são apresentados os principais resultados obtidos. No último capítulo, são mencionadas as considerações finais e propostas de trabalho futuro. Apresenta-se também, nos anexos A, B e C, alguma informação complementar que se considera relevante para a compreensão do trabalho realizado.

## 1.3. Extração de produtos naturais

### 1.3.1. Solventes não convencionais

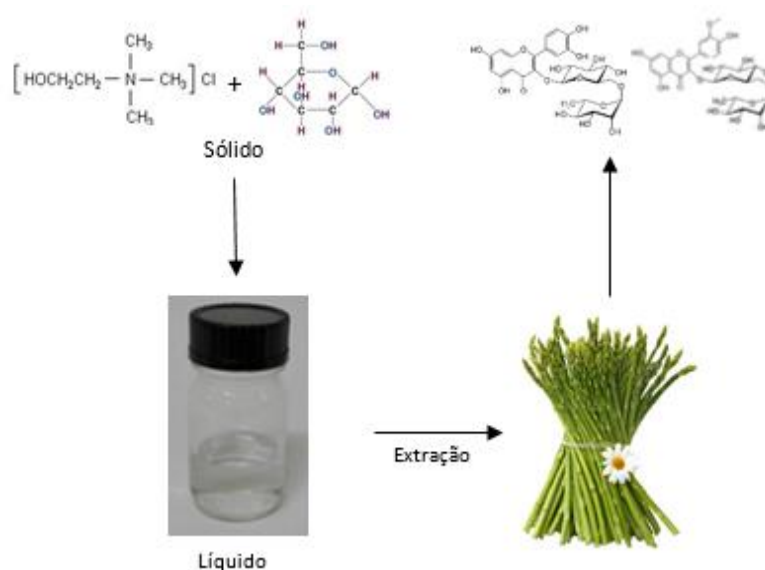
Os solventes eutéticos (DES) são misturas de compostos que apresentam um ponto de fusão muito menor do que o dos seus componentes individuais devido sobretudo à existência de forças intermoleculares intensas entre si do tipo ligações de hidrogénio (Figura 1.2).



**Figura 1.2.** Diagrama de fases sólido-líquido, com formação de um ponto eutético.

São alternativas promissoras aos solventes orgânicos voláteis tradicionais, uma vez que muitos deles poderão ser facilmente preparados a partir de compostos naturais (Pena-Pereira & Namieśnik 2014).

Um dos componentes mais utilizados na formação destes solventes eutéticos é o cloreto de colina (CC). No entanto, os DES não podem ser considerados como líquidos iônicos uma vez que não são inteiramente compostos por espécies iônicas e podem ser obtidos a partir de espécies não – iônicas (Zhang *et al.* 2012).



**Figura 1.3.** Representação de um processo de extração utilizando um solvente eutético.

Os solventes eutéticos são uma alternativa aos líquidos iônicos uma vez que são mais fáceis de produzir, envolvem um menor custo das matérias-primas podendo ser menos tóxicos, e, geralmente, biodegradáveis (Paiva *et al.* 2014).

Abbott *et al.* (2003) foram os pioneiros na introdução dos solventes eutéticos, que têm sido reconhecidos como uma nova classe de solventes “verdes” porque são produzidos a partir da mistura de dois ou mais compostos, ocorrendo naturalmente, e portanto, são preferíveis aos ILS que têm propriedades físico-químicas muito semelhantes. Como resultado, os solventes eutéticos ganharam um interesse crescente como solventes atraentes numa variedade de áreas científicas e tecnológicas (Nam *et al.* 2015).

Por outro lado, Choi *et al.* (2011) descobriram mais de 100 solventes eutéticos a partir de metabolitos existentes nas plantas e relataram que a capacidade de solvatação destes solventes é maior do que a de água (Tang *et al.* 2015).

### 1.3.2. Propriedades físicas dos solventes utilizados neste trabalho

Para a realização deste trabalho foi necessário recolher informação sobre as propriedades físicas dos solventes/soluções aqui utilizados, em particular sobre a massa volúmica e a viscosidade.

A elevada viscosidade dos DES é, muitas vezes, atribuída à presença de fortes ligações de hidrogénio entre os componentes. A diluição com água poderá não só reduzir eficazmente a viscosidade do DES, mas também manter a sua estrutura, facilitando as suas diferentes aplicações (Dai *et al.* 2015).

### 1.3.3. Exemplos de aplicação

Os flavonoides representam um grande grupo de compostos bioativos, com diversas atividades biológicas na prevenção e tratamento de muitas doenças crónicas, tais como doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, doença hepática, inflamação e cancro (Fang *et al.* 2015). Este grupo de compostos fenólicos representa os principais compostos no reino das plantas, sendo a rutina (3-*O*-rutinósido de quercetina) um dos principais flavonoides presentes. Este composto encontra-se amplamente distribuído numa grande variedade de plantas, incluindo *Asparagus acutifolius* L., trigo mourisco, *Flos Sophorae* Immaturus, folhas de tabaco, etc. (Kraujalis *et al.* 2015).

A rutina é avaliada como um potencial agente antioxidante e anti-inflamatório, promovendo a saúde humana, devido às suas várias atividades biológicas e fisiológicas, incluindo atividade citoprotectora, antiplaquetária, anti-tumoral, e antibacteriana (Kraujalis *et al.* 2015) sendo, desta forma, largamente aplicada na indústria farmacêutica. Devido a estas propriedades benéficas, foram desenvolvidos vários métodos de extração para a obtenção da rutina a partir de vários materiais vegetais.

Na literatura é possível encontrar informação sobre a extração de rutina utilizando líquidos iónicos, mas não de solventes eutéticos. A informação recolhida apresenta-se na Tabela 1.1.

**Tabela 1.1.** Revisão bibliográfica sobre extração de rutina de fontes vegetais, utilizando líquidos iônicos.

Técnica de extração	Fonte		Solvente	Concentração	Condições de extração				Rutina (mg/g)	Referências
	Planta	Parte			Tempo (min)	Temp. (°C)	S/L (g/L)	Potência (W)		
Extração assistida por microondas	<i>Sorbus tianschanica</i>	Folha	Tetrafluoroborato de 1-hexil-3-metilimidazólio	1,0 M	19	80	67	419	0,72	(Gu <i>et al.</i> , 2016)
	<i>Saururus chinensis</i> (Lour.) Baill.	Erva <sup>a</sup>	Brometo de 1-butil-3-metilimidazólio	-	12	60	33	-	4,87	(Zeng <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Flos sophorae</i> .	Flor seca	Brometo de 1-butil-3-metilimidazólio	-	10	70	33	-	172	(Zeng <i>et al.</i> 2010)
	<i>Populus alba</i> L. × <i>Populus berolinensis</i>	Casca	Tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio	1,0 M	20	20	40	400	2,40	(Chen <i>et al.</i> 2014)
Extração de fase sólida	<i>Lotus plumule</i>	Erva	Polímero carboximetil-hidroxiopropil-β-ciclodextrina	-	30	20	-	-	67	(Gong <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Saururus chinensis</i>	Erva <sup>a</sup>	Brometo de 1-butil-3-metilimidazólio	2,0 M	12	60	-	-	4,76	(Zeng <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Flos sophorae</i>	Erva <sup>a</sup>	Brometo de 1-butil-3-metilimidazólio	2,0 M	10	70	-	-	169	(Zeng <i>et al.</i> 2012)
	<i>Hibiscus mutabilis</i> L.	Folha	Carbonato de sódio Tetraborato de sódio decahidratado	(15,0 wt. %) (1,5 wt. %)	15	25	40	-	5,45	(Xie <i>et al.</i> 2011)
Extração assistida por ultrassons	<i>Ficus carica</i> L.	Folha Polpa Casca	Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio	1,0 M	30	30	20	100	2,22 1,08 1,34	(Qin <i>et al.</i> 2015)
Extração assistida por micro-ondas e ultrassons	<i>Abutilon theophrasti</i> Medik.	Folha	Brometo de 1-butil-3-metilimidazólio	2,0 M	12	60	31	50	5,49	(Zhao <i>et al.</i> 2014)
Extração líquida pressurizada	<i>Flos sophorae, Immaturus</i>	Erva <sup>a</sup>	Cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio	1,0 M	5	120	-	-	196	(Wu <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Crateagus pinnatifida</i> Bunge	Erva <sup>a</sup>	Cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio	1,0 M	5	120	-	-	0,75	(Wu <i>et al.</i> 2012)
	<i>Hypericum japonicum</i> Thunb	Erva <sup>a</sup>	Cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio	1,0 M	5	120	-	-	2,35	(Wu <i>et al.</i> 2012)
	<i>Folium mori</i>	Erva <sup>a</sup>	Cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio	1,0 M	5	120	-	-	1,05	(Wu <i>et al.</i> 2012)

<sup>a</sup> Ervas medicinais chinesas

Na literatura é possível, no entanto, encontrar informação sobre extração de outros compostos fenólicos utilizando solventes eutéticos. Assim, a Tabela 1.2 e a Tabela 1.3 apresentam uma compilação dos 11 trabalhos dedicados à extração de flavonoides e de outros compostos fenólicos, respetivamente, mencionando o solvente ótimo e a técnica de extração. As técnicas de extração mais utilizadas foram a extração assistida por micro-ondas (5 trabalhos) e a extração assistida por ultrassons (3 trabalhos).

Recentemente, Nam *et al.* (2015) estudaram a extração de glucósidos de quercetina, canferol, isoramnetina a partir de *Flos sophorae*, testando sete solventes eutéticos (diversas combinações de cloreto de colina, ácidos orgânicos, álcoois, açúcares, etc.). O solvente escolhido como ótimo foi L-prolina + glicerol (2:5) utilizando a técnica de extração assistida por ultrassons, com *razão S/L* de 50 g/L, durante 45 min à temperatura ambiente, com 10 % de água.

Bi *et al.* (2013) aplicaram a técnica de aquecimento para a extração de miricetina e amentoflavona a partir de *Chamaecyparis obtusa* (Siebold & Zucc.) Endl., utilizando diversos DES compostos por cloreto de colina e um álcool, cujas condições ótimas foram obtidas utilizando o solvente 1,4 - butanodiol - CC (1:5), com *razão S/L* de 100 g/L, durante 40 min, com 35 % de água e temperatura de extração de 70 °C.

Yao *et al.* (2015) para a extração de hiperina (3-*O*-β-D-galactopiranosídeo de quercetina), 2-*O*-galoil-hiperina, quercitrina, *O*-ramnósido de quercetina e chimafilina a partir de *Pyrola incarnata* Fisch, utilizaram a extração assistida por micro-ondas, através da combinação de cloreto de colina com um álcool. Desta forma, o solvente CC - 1,4 - butanodiol (1:4) apresentou uma maior eficiência de extração, comparativamente com os seis solventes testados, com um teor em água de 30 %, durante 20 min, a uma temperatura de 70 °C e com uma *razão S/L* de 100 g/L.

Qi *et al.* (2015) demonstraram que dos nove solventes testados, através de combinações de cloreto de colina e de hidrocloreto de betaína com um álcool, o solvente CC - hidrocloreto de betaína – etilenoglicol (1:1:2) mostrou maior eficiência de extração dos compostos ativos de *Equisetum palustre* L., aplicando uma extração assistida por cavitação de pressão negativa. As condições ótimas de extração foram: teor em água de 20 %, durante 20 min, à temperatura de 60 °C e com uma *razão S/L* de 40 g/L.

Por fim, Bubalo *et al.* (2016) estudaram a eficiência da extração de dez flavonoides (antocianinas, flavonois e flavonoides), testando diversas combinações de DES (cloreto de colina, álcoois, ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos), tendo sido o solvente CC – ácido oxálico (1:1) selecionado como o solvente mais promissor e eficaz na extração dos compostos fenólicos da pele de *Vitis vinifera* cv. Plavac mali (uva), em comparação como os solventes orgânicos convencionais, utilizando a técnica de extração por ultrassons. As condições ótimas foram: *razão S/L* de 100 g/L, durante 50 min, teor em água de 25 % e temperatura de extração de 65 °C.

**Tabela 1.2.** Revisão bibliográfica sobre extração de flavonóis utilizando solventes eutéticos, diferentes técnicas e condições de extração.

Composto	Fonte natural	Técnica de extração e solvente ótimo	Referências
Glucósido de quercetina, canferol, isoramnetina	<i>Flos sophorae</i>	EAU L-prolina - glicerol (2:5) % (w/w) de água: 10 %	(Nam <i>et al.</i> 2015)
Miricetina, amentoflavona	<i>Chamaecyparis obtusa</i> (Siebold & Zucc.) Endl.	Aquecimento 1,4-butanodiol - CC (1:5) % (v/v) de água: 35 %	(Bi <i>et al.</i> 2013)
Hiperina, 2- <i>O</i> -galoil hiperina, quercitrina, quercetina 3- <i>O</i> -ramnósido, chimafilina	<i>Pyrola incarnata</i> Fisch	EAM CC - 1,4-butanodiol (1:4) % (v/v) de água: 30 %	(Yao <i>et al.</i> 2015)
3- <i>O</i> -β-D-Glucopiranosido-7- <i>O</i> -β-D-glucopiranosido de canferol, 3- <i>O</i> -β-D-rutinósido-7- <i>O</i> -β-D-glucopiranosido de canferol, 7- <i>O</i> -β-D-glucopiranosido de luteolina, 3- <i>O</i> -β-D-glucopiranosido de quercetina, 5- <i>O</i> -β-D-glucopiranosido de apigenina, 5- <i>O</i> -β-D-glucopiranosido de genkuanin, luteolina, apigenina, genkuanina (7-metileter de apigenina)	<i>Equisetum palustre</i> L.	NPCE CC - hidrocloreto de betaína – etilenoglicol (1:1:2) % (v/v) de água: 20 %	(Qi <i>et al.</i> 2015)
Antocianinas (3- <i>O</i> -monoglucósido de delphinidina, 3- <i>O</i> - monoglucósido de cianidina, 3- <i>O</i> -monoglucósido de petunidina, 3- <i>O</i> - monoglucósido de peonidina, 3- <i>O</i> -monoglucósido de malvidina, 3- <i>O</i> -acetilmonoglucósido de malvidina, 3-(6- <i>O</i> - <i>p</i> -comaroil)-monoglucósido de peonidina, 3-(6- <i>O</i> - <i>p</i> -comaroil)monoglucósido de malvidina)	<i>Vitis vinifera</i> cv. Plavac mali	EAU CC – ácido oxálico (1:1) % (v/v) de água: 25 %	(Bubalo <i>et al.</i> 2016)
Flavanóis ((+)-catequina) Flavonoides (3- <i>O</i> -glucósido de quercetina)			

EAU - Extração assistida por micro-ondas; EAU - Extração assistida por ultrassons; NPCE - Extração por cavitação de pressão negativa.

Na Tabela 1.3 apresenta-se uma compilação de trabalhos da literatura sobre a utilização de solventes eutéticos na extração de outros compostos fenólicos.

Dai *et al.* (2013b) testaram também diversos solventes, efetuando as extrações de compostos fenólicos à temperatura de 40 °C, durante 1 h, a partir da fonte vegetal *Carthamus tinctorius* L.. Os resultados obtidos revelaram que, dependendo dos compostos alvo, os rendimentos de extração são mais elevados utilizando os solventes prolina - ácido málico (75 %) ou ácido láctico-glucose-água (75 %).

Wei *et al.* (2015b) utilizaram a técnica de micro-ondas para a extração de quatro flavonoides principais a partir de *Radix Scutellariae* L.. Neste caso, o solvente CC – ácido láctico (1:2) mostrou ser o solvente mais eficiente utilizando uma *razão S/L* de 50 g/L, durante 10 min, um teor em água de 20 %, a 55 °C.

Wei *et al.* (2015a) descreveram a extração com micro-ondas de nove compostos fenólicos a partir de folhas de *Cajanus Cajan* (L.) Millsp., onde o maior rendimento foi obtido através do solvente CC - maltose (1:2) As restantes condições ótimas de extração foram: teor em água de 20 %, à temperatura de 60 °C, com um tempo de extração de 12 min e uma *razão S/L* de 33 g/L.

Cui *et al.* (2015) também utilizaram a espécie *Cajanus Cajan* (L.) Millsp. para estudaram a eficiência de extração de flavonoides específicos, tais como gestinina, genisteína e apigenina, utilizando o método assistido por micro-ondas. O solvente CC - 1,6 – hexanodiol (7:1) resultou numa extração mais eficiente. O desempenho ideal foi à temperatura de 80 °C, durante 11 min, com um teor de água de 30 % e uma *razão S/L* de 71 g/L.

Park *et al.* (2014) relatam a extração assistida por ultrassons de dois ácidos fenólicos a partir de *Herba Artemisiae Scopariae*. Estes autores testaram doze solventes eutéticos diferentes, entre os quais, cloreto de colina e um álcool, e um ácido orgânico, assim como também um sal e um álcool, cloreto de tetrametilamónia com um fenol, e com um ácido orgânico. Posteriormente, foram ainda testados brometo trifenilmetilfosfónio com um álcool, e uma amida, variando as proporções entre os solventes, tendo o solvente cloreto de tetrametilamónio – ureia (1:4) misturado com metanol-água (60:40, v/v) sido considerado o melhor solvente. As condições ótimas foram obtidas a uma concentração de 50 % de solvente, a uma temperatura de 80 °C, durante 30 min, com uma *razão S/L* de 100 g/L.

Por último, os autores Peng *et al.* (2016) relatam o estudo da extração assistida por micro-ondas de cinco ácidos fenólicos, a partir de *Lonicera japonica* Thunb., utilizando diferentes solventes como cloreto de colina com um álcool, uma amida, um ácido orgânico, e um álcool de açúcar, assim como também ácidos orgânicos com um açúcar. O solvente CC – 1,3 – butanodiol (6:1) exibiu melhor rendimento de extração, relativamente a todos os solventes usados, a uma temperatura de extração de 60 °C, durante 20 min, com uma percentagem de água de 10 % e uma *razão S/L* de 111 g/L.

Em suma, a técnica de extração de flavonoides e de outros compostos fenólicos mais utilizada foi a extração assistida por micro-ondas. A gama de temperaturas para um desempenho ótimo situou-se entre 40-80 °C, para um tempo de extração entre 2 min e 1 h, uma *razão S/L* entre 30-111 g/L e um teor em água entre 10-50 % (v/v).

**Tabela 1.3.** Revisão bibliográfica sobre a extração de outros compostos fenólicos utilizando solventes eutéticos, diferentes técnicas e condições de extração.

Composto	Fonte natural	Técnica de extração e solvente ótimo	Referência
<i>Hidroxi Safflor</i> amarelo A, Cartamina, Cartormina	<i>Carthamus tinctorius</i> L.	Agitação mecânica Prolina – ácido málico – água % (v/v) de água = 25 % Ácido láctico – glucose – água % (v/v) de água = 25 %	Dai <i>et al.</i> (2013b)
Baicalina, <i>Wogonoside</i> , Baicaleína, Wogonina	<i>Radix Scutellariae</i> L.	EAM CC – ácido láctico (1:2) % (v/v) de água: 20 %	(Wei <i>et al.</i> 2015b)
Glucósido de flavonoide (orientina, apigenina-6,8-di-C- $\alpha$ -L-arabinósido) Agliconas de flavonoides (luteolina, cajanol, pinostrobrina, chalcona pinostrobrina) Estilbenos (longistilina C, ácido cajaninstilbeno) Cumarina (cajanus lactona)	<i>Cajanus Cajan</i> (L.) Millsp.	EAM CC - maltose (1:2) % (v/v) de água: 20 %	(Wei <i>et al.</i> 2015a)
Gestinina, Genisteína, Apigenina	<i>Cajanus Cajan</i> (L.) Millsp.	EAM CC - 1,6 – hexanodiol (7:1) % (v/v) de água: 30 %	(Cui <i>et al.</i> 2015)
Ácidos fenólicos (ácido clorogénico, ácido cafeico)	Herba <i>Artemisiae scopariae</i>	EAU Cloreto de tetrametilamónio - ureia (1:4) + metanol-água (60:40, v/v)	(Park <i>et al.</i> 2014)
Ácidos fenólicos (ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, ácido 3,4- dicafeoilquínico, ácido 4,5-dicafeoilquínico)	<i>Lonicera japonica</i> Thunb.	EAM CC – 1,3 – butanodiol (6:1) % (v/v) de água: 10 %	(Peng <i>et al.</i> 2016)

EAM - Extração assistida por micro-ondas; EAU - Extração assistida por ultrassons.

O desempenho dos solventes eutéticos na extração de compostos fenólicos deverá ser comparado aos solventes convencionais. Dos artigos estudados, o solvente convencional mais utilizado foi o etanol contendo diversas proporções de água. Foram também utilizados outros solventes tais como metanol (Nam *et al.* 2015), acetonitrilo:água (30:70, *v/v*), n-hexano, metanol – HCl (100:1), acetato de etilo (Bi *et al.* 2013) e água (Dai *et al.* 2013b; Nam *et al.* 2015).

Como referenciado na bibliografia, o rendimento de extração química depende, não só da utilização de solventes com diferente polaridade como também do tempo de extração, método, temperatura, razão sólido-líquido, bem como da composição química e características físicas das amostras. Desta forma, foram aplicados diversos métodos na extração de compostos fenólicos a partir de plantas, tendo o método assistido por ultrassons o mais utilizado, a uma temperatura de 60 °C, entre 25-45 min. No entanto, foram também aplicados outros métodos de extração: o método de calor por refluxo durante 40 min (Bi *et al.* 2013), a agitação mecânica a uma temperatura de 40 °C durante 1 h (Dai *et al.* 2013b), extração por micro-ondas a uma temperatura entre os 55-60 °C durante 10-12 min (Wei *et al.* 2015b), e por último, o método de cavitação de pressão negativa com um tempo de extração de 20 min sob uma temperatura de 60 °C (Qi *et al.* 2015).

#### **1.4. Atividade antioxidante**

Um radical livre é definido como qualquer espécie que possui um ou mais elétrons desemparelhados na orbital exterior (Carocho & Ferreira 2013). Uma vez que os elétrons são mais estáveis quando emparelhados, os radicais livres apresentam maior reatividade com outras espécies químicas (Gawlik-dziki *et al.* 2013).

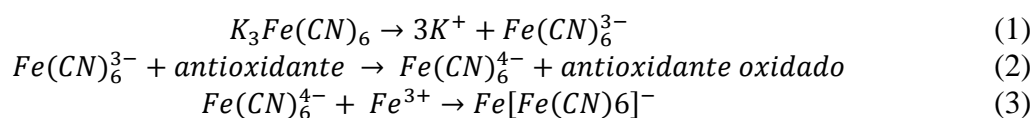
No entanto, em concentrações baixas ou controladas, as espécies reativas são essenciais para a existência e o desenvolvimento das células, estando envolvidas em vários processos fisiológicos (Fang *et al.* 2002). Os radicais livres, quando em excesso, afeta o equilíbrio entre os mesmos e as defesas antioxidantes, e nestes casos, ocorre o stresse oxidativo (Valle 2011).

O elevado potencial antioxidante dos alimentos de origem vegetal é bastante benéfico para a saúde humana, muitas vezes associado às propriedades dos compostos fenólicos que

constituem essas, mesmas, matrizes (Gawlik-dziki *et al.* 2013). Neste trabalho foram empregues quatro ensaios, de forma a avaliar a capacidade antioxidante da amostra em estudo, posteriormente, é feita uma breve análise dos mesmos.

#### 1.4.1. Poder redutor

Este ensaio tem como intuito medir a capacidade de um dado antioxidante, reduzindo o complexo Fe(III)/ferricianeto  $[\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]^-$  a Fe(II), forma ferrosa. Assim sendo, dependendo do poder redutor dos compostos, a cor amarela da solução do ensaio altera-se para os tons de verde-escuro, e pode ser medida espectrofotometricamente a 690 nm (Reis *et al.* 2011). A reação de redução processa-se de acordo com as seguintes equações:



#### 1.4.2. Atividade captadora de radicais – DPPH

O método de DPPH, radical de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo, é um radical livre estável devido à deslocalização do eletrão de reposição sobre a molécula como um todo. Esta deslocalização do radical livre é responsável pela cor violeta intensa, característica desta molécula, caracterizada por uma absorvância a cerca de 515 nm. Quando uma solução de DPPH é misturada com substâncias capazes de doar um átomo de hidrogénio, a sua coloração violeta vai desaparecendo tornando-se amarelo pálido (Zahra *et al.* 2007). A reação do DPPH com um antioxidante pode ainda ser descrita pela seguinte equação:



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

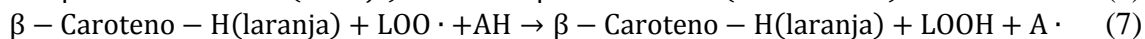
Com o propósito de avaliar a atividade antioxidante a partir da captação de radicais livres, monitoriza-se a alteração na absorvância de radicais DPPH. A percentagem de captação de radicais DPPH é calculada utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ captação de radicais DPPH} = \frac{(A_{ar} - A_{dr})}{A_{ar}} * 100 \quad (5)$$

Em que,  $A_{ar}$  é a absorvância da solução de DPPH e  $A_{dr}$  é a absorvância da solução na presença da amostra (Helena *et al.* 2010).

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

Este método baseia-se em medições espectrofotométricas da descoloração do  $\beta$ -caroteno, avaliando a capacidade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (Amarowicz *et al.* 2004). As reações que envolvem o ensaio ocorrem segundo as reações seguintes:



Onde,  $\text{LOO} \cdot$  representa o radical livre linoleato. Este mecanismo está, envolvido na descoloração dos carotenoides através da oxidação térmica, ou seja, estes perdem a sua cor laranja devido à ação de oxidantes presentes nas amostras (Amarowicz *et al.* 2004). O mesmo pode ser verificado a 470 nm.

Desta forma, quanto maior a quantidade de antioxidantes nas amostras, menor será a descoloração do  $\beta$ -caroteno. A inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno foi calculada através da equação:

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

### 1.4.4. Inibição da peroxidação lipídica

A inibição da peroxidação lipídica (TBARS) em homogeneizados cerebrais é uma consequência da peroxidação lipídica, pois as células cerebrais são altamente sensíveis aos danos oxidativos, uma vez que consomem muito oxigénio (Chong *et al.* 2005). Este método baseia-se na constatação de que durante a oxidação da maioria dos sistemas biológicos, são formadas pequenas quantidades de MDA (Malondialdeído).

Assim, a peroxidação lipídica pode ser determinada pela medição dos produtos de oxidação que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar substâncias que apresentam coloração rosada com o aquecimento, genericamente designados como substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico, sendo acompanhada por espectrofotometria em 532 nm.

O TBA em associação com o MDA, na presença de iões  $\text{H}^+$ , forma um cromogéneo (MDA-TBA). Desta forma, existem duas fases fulcrais nesta reação, inicialmente, a solução que

contém o antioxidante é oxidada devido à adição de um íon metálico, como o ferro ou o cobre, e seguidamente, a extensão desta oxidação é feita pelo ácido tiobarbitúrico, de modo que uma solução contendo um antioxidante irá interromper a oxidação (Antolovich *et al.* 2001). A inibição é avaliada medindo a intensidade da cor do composto (MDA-TBA), a 532 nm e, calculada, de acordo com a seguinte expressão:

$$\text{Inibição da peroxidação lipídica (\%)} = \left[ \left( \frac{A - B}{A} \right) \right] * 100 \quad (9)$$

Em que, A é a absorvância do controlo, e B a absorvância da solução da amostra.

### **1.5. Avaliação da hepatotoxicidade dos extratos**

A toxicidade é um dos parâmetros cruciais para a avaliação de resposta biológica e do potencial lesivo que pode levar à morte de células ou tecidos. Deste modo, para a avaliação da toxicidade dos extratos e do solvente puro, em células não tumorais, utilizou-se uma cultura primária (PLP2) obtida a partir de células de fígado de porco de modo a verificar a presença ou a ausência de toxicidade por parte do extrato em estudo, utilizando o ensaio da sulforodamina B (SRB). O ensaio é um método simples e rápido, que consiste na capacidade da SRB se ligar aos componentes proteicos das células fixadas pelo ácido tricloroacético, independentemente da atividade metabólica das células (Skehan *et al.* 1990).

## Capítulo 2. Materiais e métodos

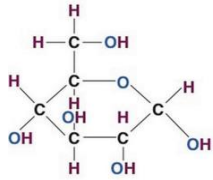
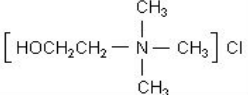
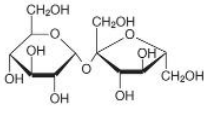
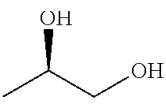
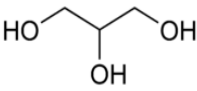
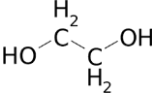
Neste capítulo será abordado o trabalho experimental, referindo os materiais e métodos usados.

### 2.1. Preparação de solventes eutéticos para os ensaios de extração

#### 2.1.1. Materiais

Na Tabela 2.1 apresentam-se a fórmula química, a pureza, o ponto de fusão e o fabricante dos compostos químicos utilizados neste trabalho para a preparação dos solventes.

**Tabela 2.1.** Origem, pureza e ponto de fusão dos solventes utilizados.

Composto	Fórmula química	Pureza	Ponto de fusão	Fabricante
Glucose		≥ 0,99 %	146 °C	Analar normapur – VWR chemicals
Cloreto de colina		≥ 0,99 %	302 °C	Acros organics
Sacarose		≥ 0,99 %	186 °C	Analar normapur – VWR chemicals
1,2 - Propanodiol		≥ 0,99 %	-59 °C	Sigma-Aldrich
Glicerol		≥ 0,99 %	17,8 °C	Fisher chemicals
Etilenoglicol		≥ 0,99 %	- 12,9 °C	Carlo Erba Reagents

Os DES preparados resultam da combinação do cloreto de colina com um álcool (glicerol, etilenoglicol ou 1,2-propanodiol) ou com um açúcar (glucose ou sacarose). Posteriormente, testaram-se ainda os solventes puros, sempre que estes se encontrassem no estado líquido à temperatura ambiente. Por fim, testou-se ainda alguns solventes puros em conjunto com uma proporção de água de 20 % (w/w).

### *2.1.2. Preparação dos solventes eutéticos*

Neste estudo, foi utilizado o método de aquecimento e de agitação para a preparação dos solventes eutéticos (DES). A mistura foi aquecida a 60 °C sob agitação constante durante cerca de 30 min até à formação de uma solução homogénea. Adicionalmente, as diversas soluções de DES foram preparadas por diluição de diferentes percentagens de água desionizada.

### *2.1.3. Titulação por Karl-Fisher*

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 foi avaliada pelo método de Karl-Fischer. Os valores obtidos foram tidos em consideração na preparação das soluções aquosas de cada um dos compostos.

## **2.2. Preparação de amostras**

As amostras da planta *Asparagus acutifolius* L. (corruda-menor, espargo-bravo-menor ou espargo-silvestre-menor) foram recolhidas no mercado comercial. 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. As amostras foram liofilizadas e mantidas nas melhores condições, por refrigeração, num recipiente hermético de modo a não adquirir humidade, para uso posterior (Barros *et al.* 2011).

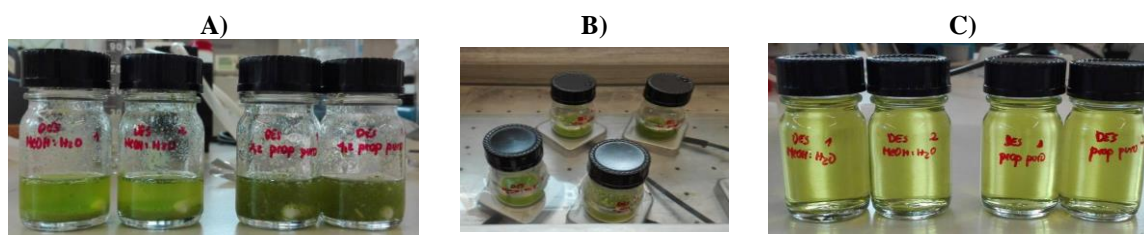
### 2.3. Extração por maceração

A partir de uma combinação de experiências com variáveis individuais, considerando as extrações anteriores efetuadas no nosso laboratório e material bibliográfico, as variáveis relevantes e os intervalos necessários foram selecionados e testados para a técnica de extração por maceração. As amostras liofilizadas em pó (300 mg) foram colocadas num frasco com o solvente apropriado (10 mL). O frasco foi colocado num banho de água com termostato para o controlo da temperatura (30 °C) com uma agitação eletromagnética contínua, através de uma placa submersível de agitação magnética (Microstirrers, *Thermo Scientific, USA*), durante o período de tempo desejado (1 h).

As condições descritas anteriormente foram as iniciais sendo estas, posteriormente, otimizadas de acordo com a Tabela 2.2, que apresenta os valores codificados para os intervalos selecionados das variáveis testadas no processo de otimização da extração.

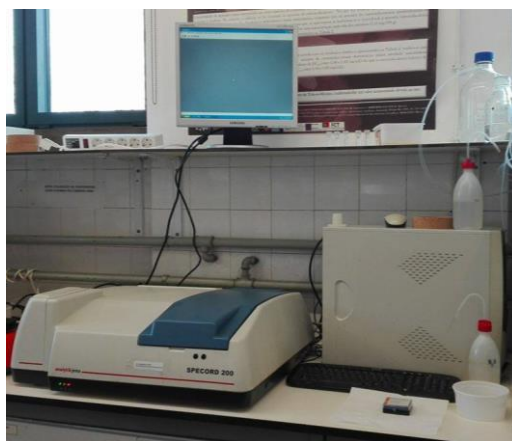
### 2.4. Análise quantitativa da rutina por espectrofotometria UV-Vis

No fim da extração, adicionou-se 30 mL de água, de forma a diluir o extrato quatro vezes. De seguida, verteu-se o conteúdo do frasco para tubos de *falcon* e levou-se a centrifugar, a uma temperatura de 25 °C, 4000 rpm, durante 10 minutos. A amostra assim diluída foi filtrada através de um filtro descartável LC de Ø150 mm, transferida para uma cuvete de quartzo para posterior análise por espectrofotometria UV-Vis. Na Figura 2.1 apresenta-se uma representação esquemática das etapas fundamentais.



**Figura 2.1.** Representação esquemática do processo de extração: **A)** Junção do solvente + planta; **B)** Processo de extração, no banho a 30 °C, através de placas de agitação; **C)** Amostras de soluções do extrato para análise por UV-Vis.

Foi utilizado o espectrofotômetro (UV-Vis), da marca SPERCORD 200, pertencente ao Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada da Escola Superior Agrária, com células de quartzo de 10 mm. Neste método, a absorvância da amostra é medida a um comprimento de onda de 370 nm, contra um branco. Caso a absorvância, lida pelo espectrofotômetro, seja superior a 1, dilui-se o extrato de novo quatro vezes. As análises foram efetuadas em duplicado.



**Figura 2.2.** Espectrofotômetro (UV-Vis) da marca SPERCORD 200 usado neste trabalho.

## **2.5. Análise quantitativa da rotina por HPLC-DAD**

No fim da extração, retirou-se 1 mL da solução de extrato para um *eppendorf*, 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-DAD.

Segundo o perfil fenólico da amostra, previamente, caracterizado pelo grupo de investigação da Professora Isabel Ferreira usando o equipamento HPLC-DAD (Barros *et al.* 2011), recorreu-se à monitorização das extrações através da análise nas mesmas condições. Os extratos fenólicos foram avaliados utilizando 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).



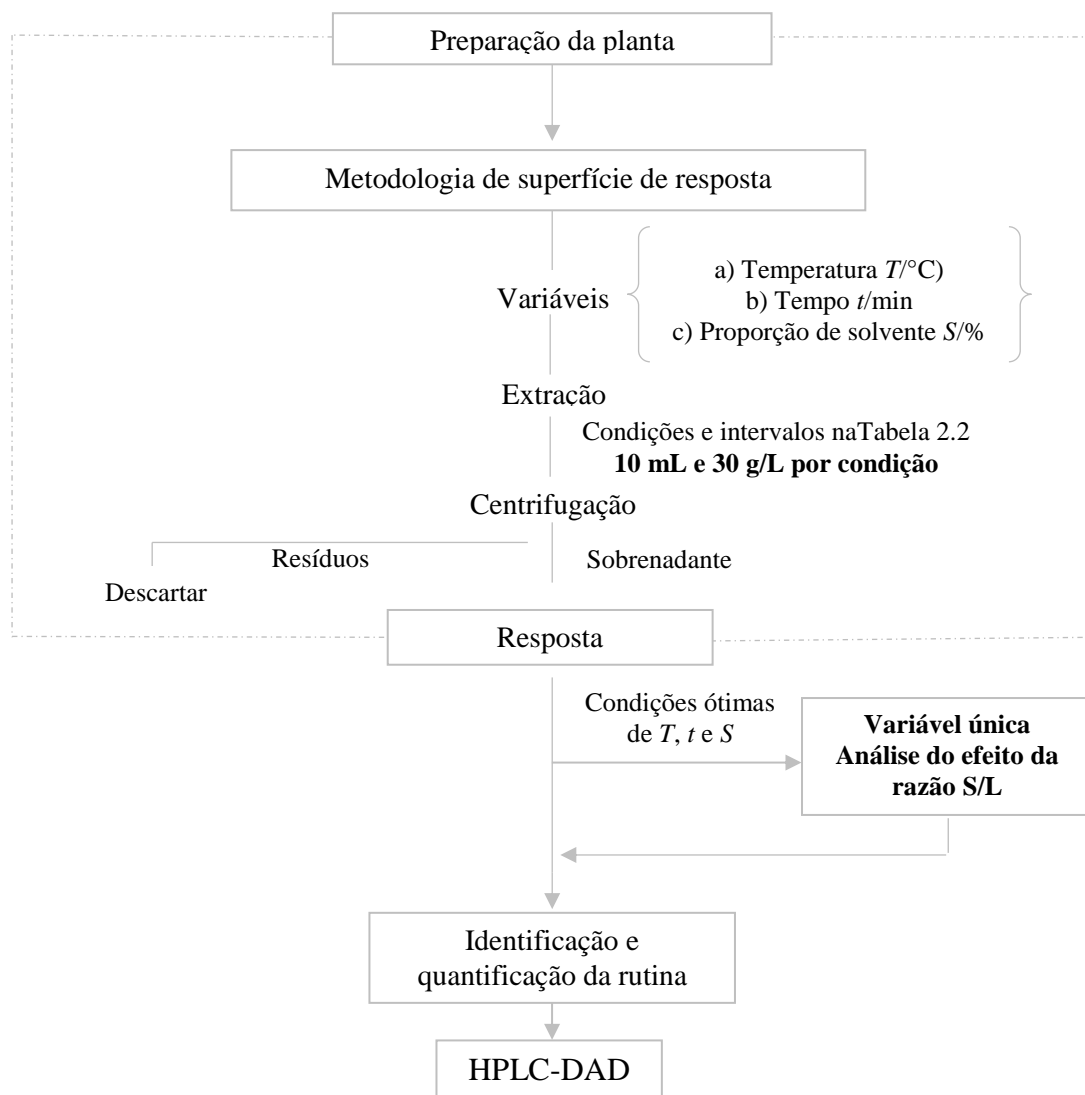
**Figura 2.3.** Equipamento HPLC-DAD.

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 deteção realizada *online* no DAD, utilizando 370 nm como comprimentos de onda.

A rotina foi caracterizada de acordo com o seu espectro UV e tempo de retenção, em comparação com os padrões. A elevada capacidade das extracções foi determinada pela análise quantitativa, através da curva de calibração de 3-*O*-rutinosido de quercetina (rutina). Os resultados foram expressos em mg/g de material seco.

## **2.6. Otimização do processo de extração utilizando a metodologia de superfície de resposta**

Inicialmente, efetuou-se uma seleção preliminar de solventes eutéticos, fixando as restantes condições de extração já adotadas no método convencional: tempo de extração de 1 hora, razão sólido-líquido 30 g/L e temperatura de 30 °C. Após a seleção do solvente mais adequado, aplicou-se uma metodologia de superfície de resposta (RSM) de forma a otimizar as condições experimentais do método de extração de maceração, tal como se descreve nas secções seguintes. Na Figura 2.4 apresenta-se uma sequência esquemática do trabalho levado a cabo para otimizar a extração de rutina.



**Figura 2.4.** Sequência esquemática do trabalho de otimização das condições de extração da rotina.

### 2.6.1. Planeamento experimental

A partir de testes preliminares, selecionaram-se três variáveis como sendo as mais relevantes no processo de extração: tempo ( $t$ , min), temperatura ( $T$ , °C) e proporção de solvente ( $S$ , %). Essas variáveis foram estudadas efetuando uma análise multivariável através de critérios experimentais de RSM (Box *et al.* 1957). Inicialmente, aplicou-se uma metodologia de superfície de resposta a três variáveis conhecida como planeamento *composto central circunscrito* (CCCD) para otimizar as condições de extração dessas variáveis. Nesta primeira abordagem todas as condições que maximizaram a resposta foram bem detetadas.

De forma complementar, efetuou-se o *planeamento fatorial completo (FFD)* de duas variáveis ( $t$  e  $T$ ), de forma a verificar a sua resposta interativa e confirmar os valores ótimos obtidos. Deste modo, os dois modelos de planeamento experimental utilizados na otimização das condições de extração de rotina foram os seguintes:

a) Para a análise das três variáveis ( $X_{1-3}$ ) foi utilizado um *planeamento composto central circunscrito (CCCD)*. Neste modelo, os pontos experimentais são gerados numa esfera em torno do ponto central, exigindo 5 níveis de cada fator e 3 repetições por cada preparação.

b) Para a análise de duas variáveis ( $X_{1-2}$ ) foi utilizado um *planeamento fatorial completo (FFD)*, com três repetições por condição. A estrutura de um *FFD* implica que todas as combinações de três valores para cada fator sejam estudadas (mínima, média e máxima).

Na Tabela 2.2 apresenta-se o domínio experimental e a codificação das variáveis independentes relativas aos dois modelos de planeamento experimental.

**Tabela 2.2.** Domínio experimental e codificação das variáveis independentes das abordagens *CCCD* e *FFD*.

Valores codificados	Valores naturais		
	$t$ (min)	$T$ (°C)	$S$ (%)
<b>A) Modelo composto central circunscrito (CCCD)</b>			
-1.68	30	30	0
-1	54,2	42,2	20,2
0	90	60	50
+1	125,8	77,8	79,8
+1.68	150	90	100
<b>B) Modelo fatorial completo (FFD)</b>			
-1	55	60	--
0	85	75	--
+1	115	90	--

### 2.6.2. Modelo matemático

Independentemente da metodologia RSM utilizada (com duas ou três variáveis), o modelo para a análise das respostas produzidas é a seguinte equação polinomial de segunda ordem:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{\substack{j=2 \\ j>i}}^n b_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^n b_{ii} X_i^2 \quad (10)$$

Onde  $Y$  é a variável dependente (variável de resposta) para ser modelado,  $X_i$  e  $X_j$  definem as variáveis independentes,  $b_0$  é o coeficiente constante,  $b_i$  é o coeficiente de efeito linear,  $b_{ij}$  é o

coeficiente de efeito de interação,  $b_{ii}$  é o coeficiente de efeito quadrático e  $n$  é o número de variáveis (Box & Hunter 2005). Embora os parâmetros estatísticos consistentes do modelo assim obtidos sejam empíricos, são bastante úteis para prever os resultados de condições de operação não testadas (Pinela *et al.* 2016).

O sinal do efeito marca o desempenho de resposta. Desta forma, quando um destes fatores tem um efeito positivo, a resposta é superior a um nível elevado e quando um fator tem um efeito negativo, a resposta é mais baixa no nível elevado. Quanto maior for o valor absoluto de um coeficiente, mais importante é o peso da variável correspondente (Heleno *et al.* 2016).

### 2.6.3. Procedimento simplex de otimização das variáveis para uma resposta máxima

Para otimização das condições de extração, as respostas paramétricas produzidas pelo modelo foram integradas através de uma ferramenta *simplex* para resolver problemas não-lineares (Heleno *et al.* 2016; Pinela *et al.* 2016) e encontrar os valores das variáveis que irão maximizar a extração de rutina. Colocaram-se limitações nos valores das variáveis codificadas de modo a evitar condições não naturais (*i.e.*, tempos inferiores a 0 ou valores de  $S$  superiores a 100 %).

## 2.7. Análise da dose-resposta da razão sólido/líquido

Nas condições ótimas de tempo ( $X_1, t$ ), temperatura ( $X_2, T$ ) e proporção de solvente ( $X_3, S$ ), foi efetuada uma análise dose-resposta da razão sólido/líquido ( $X_4, \text{razão } S/L$ ) para descrever o seu comportamento. A descrição do efeito de resposta ( $R$ ) em função da variação da razão  $S/L$  é realizada através da equação de Weibull (Murado & Prieto, 2013; Weibull & Sweden, 1951), com algumas modificações apropriadas aos objetivos pretendidos, da seguinte forma:

$$R = K \{1 - \exp[-\ln 2 (t/m)^a]\} \quad (11)$$

Onde  $K$  é a assíntota,  $m$  é a dose necessária para 50 % de resposta (meia-vida) e  $a$  é um parâmetro de forma relacionado com o declive máximo da resposta.

Podem obter-se dois parâmetros adicionais e significativos a partir da Eq.[12] que correspondem à velocidade máxima ( $v$ ) e à fase de atraso ( $\lambda$ ), como se segue:

$$v = \frac{K \alpha}{\tau} (\ln 2)^{\frac{1}{\alpha}} G^G \exp(-G), \quad \text{onde} \quad G = \frac{\alpha - 1}{\alpha} \quad (12)$$

$$\lambda = \tau \ln 2 \left[ G^{\frac{1}{a}} + \frac{e^{-G} - 1}{aG^G e^{-G}} \right] \quad (13)$$

Na Tabela 2.3 apresenta-se o estudo da variável *razão S/L* para detecção do ponto de saturação na extração da rutina.

**Tabela 2.3.** Análise da variável *razão S/L* para a detecção do ponto de saturação da extração da rutina nas condições ótimas encontradas, previamente analisadas por RSM.

Ensaios	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>X</i> <sub>4</sub> : <i>S/L</i> (g/L)	5	15	30	40	50	60	70	80	90	100	150

## 2.8. Análise estatística

Todos os procedimentos apropriados, estimativas dos coeficientes e cálculos estatísticos foram realizados usando a *Microsoft Excel* e as ilustrações gráficas apresentadas foram desenvolvidas no *software* DeltaGraph V6. A análise apropriada e a estatística dos resultados experimentais, de acordo com as equações propostas, foram realizadas em quatro fases:

- *Determinação dos coeficientes*: as estimativas paramétricas foram obtidas pela minimização da soma das diferenças quadráticas entre os valores observados e previu - modelo, usando o método dos mínimos quadrados não-lineares (quasi-Newton), método fornecido pelo Solver no *Microsoft Excel 2003* (Kemmer & Keller 2010), o qual permite um teste rápido das hipóteses e das suas consequências (M. A. G. Murado & Lage 2013).

- *Coefficiente de significância*: A determinação dos intervalos paramétricos fiáveis foram feitos usando o 'SolverAid' (Prikler, 2009). O modelo foi simplificado, deixando os termos que não foram estatisticamente significativos a  $\alpha = 0.05$ .

- *Outros critérios de avaliação estatística*: Para voltar a verificar a uniformidade do modelo RSM foram aplicados os seguintes critérios: (a) A macro 'SolverStat' (Comuzzi *et al.* 2003), o qual é usado para a avaliação de parâmetros e uma previsão das incertezas do modelo; (b)  $R^2$  é interpretado como a percentagem de variabilidade da variável dependente explicada pelo modelo; (c) Coeficientes ajustados de determinação múltipla ( $R^2_{adj}$ ) o qual é usado uma correção para  $R$ , tendo em conta o número de variáveis utilizadas no modelo; (d) Os fatores de precisão de todas as equações foram calculados para avaliar a qualidade dos acessórios para

os dados experimentais, como o erro médio quadrático (MSE), o *Root Mean Square* dos erros (RMSE) e o erro percentual médio absoluto (MAPE); (e) O coeficiente de Durbin-Watson (DW) para verificar se os resíduos do modelo não são auto-correlacionados; e, (f) A análise da tabela de variância (ANOVA) para avaliar o poder explicativo das variáveis.

## 2.9. Avaliação da atividade antioxidante nas condições ótimas de extração de rutina

### 2.9.1. Preparação da amostra

Os extratos fenólicos foram preparados a partir de amostras de espargos liofilizados. A informação dos espargos utilizados encontra-se descrita no Capítulo 1.

As extrações foram realizadas por agitação magnética de 150 mg da amostra com 10 mL de solvente, como referido anteriormente, durante 85 minutos, sendo o extrato obtido filtrado através de filtros de papel Whatman Nº 4. Foram utilizadas diferentes concentrações de extratos (15-0,47 mg/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.

A partir da solução inicial foram preparadas várias soluções com concentrações distintas através do método das diluições sucessivas. Na Figura 2.5 podem observar-se as diluições efetuadas para o 1,2-propanodiol puro e para solvente de referência, MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20, v/v). As soluções diluídas foram utilizadas na realização do estudo da atividade antioxidante.



**Figura 2.5.** Fotografia das soluções diluídas utilizadas no estudo da atividade antioxidante.

Posteriormente, recorreu-se a quatro ensaios *in vitro* para avaliar a atividade antioxidante das amostras, sendo eles denominados de poder redutor, efeito captador de radicais livres,

inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno e inibição da peroxidação lipídica - TBARS. Seguidamente será realizada, mais detalhadamente, uma descrição de cada método.

## 2.9.2. Métodos para avaliação da atividade antioxidante

### 2.9.2.1. Poder redutor

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

### 2.9.2.2. 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  $\mu$ L) com 270  $\mu$ L da solução metanólica de DPPH ( $6 \times 10^{-5}$  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).

### 2.9.2.3. Inibição da descoloração do $\beta$ -caroteno

Preparou-se uma solução de  $\beta$ -caroteno por dissolução em clorofórmio. Posteriormente, transferiu-se 2 mL desta solução para um balão de 100 mL de fundo redondo. Após a remoção do clorofórmio a 40 °C, sob vácuo, 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. 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 ao fim de 120 min ( $t_{120}$ ) com prévia agitação dos tubos.

#### 2.9.2.4. Inibição da peroxidação lipídica

Utilizou-se tecido cerebral de porco dissecado e homogeneizado com tampão Tris-HCl (20 mM, pH 7,4) e após centrifugação a 3000g durante 10 minutos numa centrífuga refrigerada. Seguidamente, pipetou-se 200 µL de cada solução de extrato, 100 µL de ácido ascórbico, 100 µL de sulfato de ferro e 100 µL de sobrenadante da suspensão de cérebro de porco em cada tubo de ensaio. A mistura foi depois incubada durante 1 h a 37,5 °C num banho termostatizado. Ao fim deste tempo, a reação foi interrompida pela adição de 500 µL de ácido tricloroacético (28 %, w/v). Posteriormente, foram adicionados 380 µL de ácido tiobarbitúrico a 2 %. A mistura foi aquecida a 80 °C durante 20 min, e seguidamente, centrifugada a 3000g durante 5 min e medida a absorvância do sobrenadante no espectrofotómetro, já mencionado, a um comprimento de onda de 532 nm.

#### 2.9.3. Análise estatística dos ensaios de avaliação da atividade antioxidante

Cada ensaio de avaliação da atividade antioxidante foi realizado em triplicado e os resultados foram expressos como valores médios  $\pm$  desvio padrão (DP), respetivamente. Os resultados foram analisados por um teste *t*-student porque havia menos de três grupos de resultados com  $\alpha = 0,05$ . Este tratamento estatístico foi efetuado utilizando o programa SPSS v. 20.0.

### 2.10. Citotoxicidade

Preparou-se uma cultura de células primárias a partir de fígado fresco de porco, obtido num matadouro local, designada por PLP2 (*porcine liver primary cell culture*). Os tecidos foram lavados em solução salina de Hank contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e dividido em explantes de 1x1 mm<sup>3</sup>. Posteriormente, os explantes foram colocados em caixas de cultura com meio DMEM suplementado com SFB (10 %), 2 mM de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, e seguidamente colocados na incubadora. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias, monitorizando-se, usando um microscópio invertido (Icon Eclipse Ts 100). As células foram transferidas para uma placa de 96 poços com uma densidade de 1x10<sup>4</sup> células/poço, e cultivadas em meio DMEM com 10 % de SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células foram tratadas com diferentes concentrações de amostra e realizou-se o teste SRB (0,1 % em 1 % ácido acético). A elipticina foi utilizada como padrão.

## Capítulo 3. Resultados e discussão

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

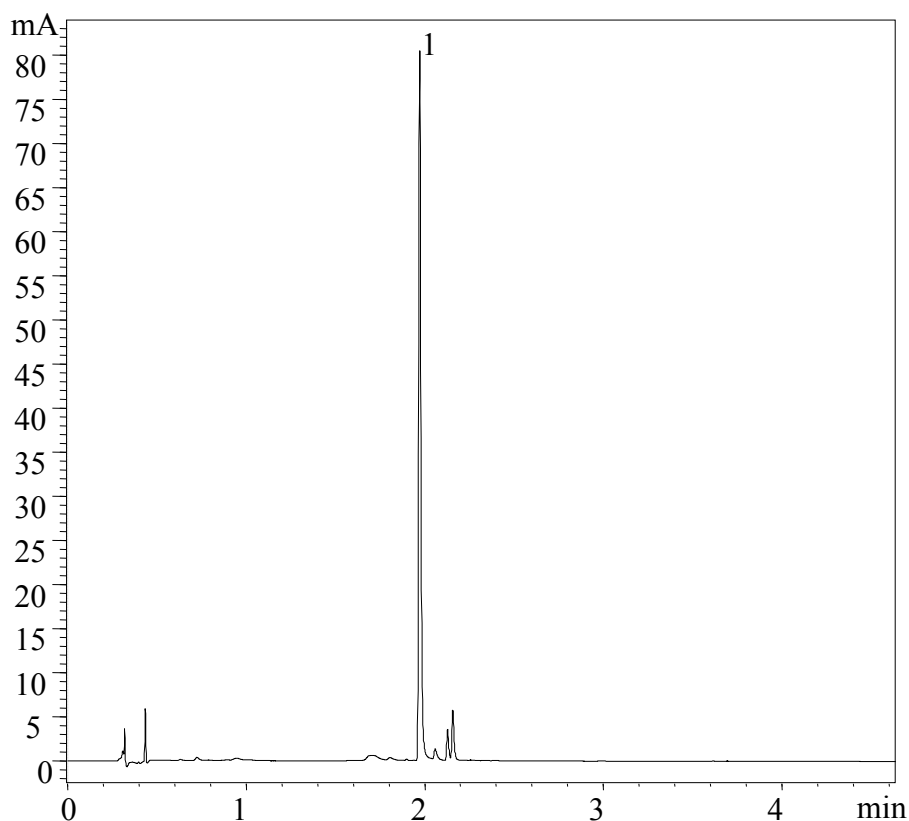
Na secção 3.2, apresentam-se os resultados da extração utilizando solventes eutéticos. Inicialmente, foram efetuados ensaios com diversos solventes, fixando a razão sólido-líquido, o tempo de extração e a temperatura. Depois, apresentam-se os resultados da otimização do processo de extração para o solvente com melhor desempenho na etapa preliminar de seleção, utilizando uma metodologia de superfície de resposta.

Finalmente, na secção 3.3, apresentam-se os resultados da avaliação da atividade antioxidante do extrato obtido em condições ótimas de extração através de quatro métodos de ensaios: efeito captador de radicais livres (DPPH), poder redutor, inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno e inibição da peroxidação lípica (TBARS). Nesta secção foi ainda avaliada a citotoxicidade do solvente ótimo em células normais.

### 3.1. Extração convencional

Barros *et al.* (2011) apresentaram os resultados da extração convencional de *Asparagus acutifolius*, à temperatura ambiente, com metanol:água (80:20%, v/v), e descreveram um perfil fenólico constituído por três flavonoides e um ácido fenólico, sendo a rutina (3-*O*-rutinósido de quercetina) o composto fenólico mais abundante.

O perfil obtido nas extrações das amostras de Barros *et al.* (2011) foi igual ao perfil obtido neste estudo nas mesmas condições e que se encontra representado na Figura 3.1. Tal como se pode observar, o pico de maior intensidade (pico 1) corresponde à 3-*O*-rutinósido de quercetina (rutina).



**Figura 3.1.** Perfil de compostos fenólicos de *A. acutifolius*, registado a 370 nm, utilizando metanol:água (80:20%, v/v) como solvente. Pico 1: 3-*O*-rutinósido de quercetina.

### 3.2. Extração não convencional

#### 3.2.1. Seleção do solvente mais apropriado

Para a seleção preliminar de solventes eutéticos, foram escolhidos quatro sistemas modelo, inicialmente descritos por Dai *et al.* (2013a): glicerol + cloreto de colina + água na proporção molar 2:1:1; 1,2-propanodiol + cloreto de colina + água na proporção molar 1:1:1; glucose + cloreto de colina + água na proporção molar 2:5:5; sacarose + cloreto de colina + água, na proporção molar 1:4:4. Adicionalmente, incluiu-se o sistema etileno glicol + cloreto de colina + água (1:1:1).

Dada a elevada viscosidade de alguns destes sistemas, numa segunda fase, estudou-se o efeito da adição de água, efetuando-se extrações adicionais com os solventes referidos, contendo 20 % (w/w) de água.

Finalmente, testou-se a possibilidade de utilizar os solventes puros, sempre que estes se apresentassem no estado líquido nas condições ambiente. É este o caso dos álcoois glicerol, etileno glicol e 1,2-propanodiol.

As restantes condições de extração foram as já adotadas no método convencional: tempo de extração de 1 hora, razão sólido-líquido 30 g/L à temperatura de 30 °C. Na Tabela 3.1 apresenta-se o rendimento obtido nas diversas extrações, efetuando a análise química por espectrofotometria UV-Vis e HPLC-DAD.

**Tabela 3.1.** Rendimento (Média ± DP) obtido na etapa inicial de seleção do solvente mais adequado para a extração de rutina.

<b>SOLVENTE (% de água, m/m)</b>	<b>UV-Vis</b> (mg/g)		<b>HPLC-DAD</b> (mg/g)	
Glucose:CC:H <sub>2</sub> O (7 %)	4,06	±0,14	1,08	±0,05
Sacarose:CC:H <sub>2</sub> O (7 %)	5,12	±0,17	1,00	±0,35
Glicerol:CC:H <sub>2</sub> O (5 %)	5,45	±0,08	3,10	±0,14
1,2-Propanodiol:CC:H <sub>2</sub> O (7 %)	5,92	±0,03	3,42	±0,17
Etilenoglicol:CC:H <sub>2</sub> O (8 %)	--		4,13	±0,04
Glucose:CC:H <sub>2</sub> O (20 %)	5,68	±0,09	3,90	±0,06
Sacarose:CC:H <sub>2</sub> O (20 %)	5,11	±0,13	3,31	±0,09
Glicerol:CC:H <sub>2</sub> O (20 %)	5,40	±0,02	4,20	±0,03
Glicerol:CC:H <sub>2</sub> O (30 %)	--		4,29	±0,01
1,2-Propanodiol:CC:H <sub>2</sub> O (20 %)	5,78	±0,06	4,84	±0,05
Etilenoglicol:CC:H <sub>2</sub> O (20 %)	--		3,84	±0,01
Glicerol puro	5,27	±0,01	2,52	±0,01
Glicerol:H <sub>2</sub> O (20 %)	5,78	±0,90	4,54	±0,16
1,2-Propanodiol puro	6,61	±0,13	3,28	±0,10
1,2-Propanodiol:H <sub>2</sub> O (20 %)	6,10	±0,18	5,16	±0,12
Etilenoglicol puro	--		5,28	±0,23
Etilenoglicol:H <sub>2</sub> O (20 %)	--		5,15	±0,13
<b>SOLVENTES DE REFERÊNCIA</b>				
H <sub>2</sub> O	4,72	±0,11	2,77	±0,01
MeOH:H <sub>2</sub> O (80:20, v/v)	6,39	±0,05	4,77	±0,01

Relativamente ao estudo destes solventes por análise UV-Vis a um comprimento de onda de 370 nm, é notório que os valores são bastante próximos entre si. Por essa razão, foi necessário complementar o método de análise UV-Vis com a análise por HPLC, método mais caro, contudo menos sujeito a interferências dos restantes componentes do extrato. Assim, após a análise dos diferentes DES por HPLC, é notória uma discrepância entre os valores, sendo que o melhor solvente dado por UV-vis não é o mesmo dado por HPLC. Assim, foram considerados nesta discussão apenas os resultados obtidos por análise cromatográfica apresentados na Tabela 3.1.

Em comparação com o solvente convencional, metanol:água (80:20 %, v/v), os solventes com maior eficiência de extração foram o etileno glicol puro e as misturas 1,2-propanodiol:água (20 %, w/w) e etileno glicol:H<sub>2</sub>O (20 %, w/w). Dado que o composto etileno glicol é mais tóxico, foi selecionado o solvente 1,2-propanodiol para a fase posterior de otimização das condições de extração descrita na secção seguinte. De facto, a mistura 1,2-propanodiol:H<sub>2</sub>O (20 %, w/w) exhibe uma maior eficiência de extração, superior ao desempenho do solvente misto metanol:H<sub>2</sub>O (80:20, v/v).

A eficiência das extrações, quer para UV-Vis quer para o HPLC, foi determinada através das curvas de calibração de 3-*O*-rutinosido de quercetina (rutina) preparadas em MeOH:H<sub>2</sub>O, utilizando concentrações conhecidas (Anexo B).

### *3.2.2. Otimização do processo de extração e verificação experimental da previsão dos resultados do modelo*

Foram efetuados estudos preliminares para selecionar as variáveis relevantes e os fatores instrumentais de modo a centralizar o domínio experimental anterior à aplicação do modelo RSM.

Embora existam estudos anteriores sobre a otimização de extração de rutina de outras matrizes naturais utilizando líquidos iónicos (Tabela 1.1) não foram encontrados trabalhos que descrevam as condições de extração de rutina de *Asparagus acutifolius* L., usando solventes eutéticos. Além disso, devido à diversidade da composição das fontes de materiais utilizados na Tabela 1.1 as condições testadas não podem ser extrapoladas diretamente na extração de rutina para a *Asparagus acutifolius* L..

Assim, para encontrar as condições que maximizam a extração de rutina, é necessário ter em conta as variáveis que afetam as extrações solvente-matriz sólida. Estas variáveis podem ser divididas em fatores não intrínsecos (tipo de solvente, *S* e razão *S/L*) e fatores intrínsecos (*t* e *T*). Foram efetuados testes preliminares para determinar o seu domínio experimental (mantendo outras constantes) na obtenção de um modelo RSM adequado através da análise das suas respostas.

Em consequência, os fatores intrínsecos e não-intrínsecos e respectivas gamas selecionados foram os seguintes:

- 1) O tipo de solvente de extração é o fator principal na separação dos compostos pretendidos. Devido à estrutura química da rutina, testaram-se diferentes solventes e misturas de solventes, tal como descrito anteriormente (Tabela 3.1), selecionando-se 1,2-propanodiol como solvente de extração. Em todos os sistemas, verificou-se que a variação da proporção de água entre 0 e 100 % alterou, significativamente, o rendimento da extração de rutina;
- 2) Quanto à *razão S/L*, a gama testada foi de 5 a 150 g/L. Pequenos valores podem levar a uma dissolução mais eficaz, causando uma melhoria de rendimento de extração, mas também a um desperdício de solvente. Uma elevada *razão S/L* resultará num rendimento de extração de rutina inferior e num desperdício de matérias-primas. Apesar de ser bastante relevante, optou-se por não efetuar a análise da *razão S/L* no processo de otimização escolhendo um valor constante de 30 g/L;
- 3) Em relação às variáveis intrínsecas  $t$  e  $T$ , a partir de uma pesquisa bibliográfica foram investigados os principais intervalos testados em processos semelhantes (Tabela 1.1), em combinação com uma variável nos estudos de tempo (mantendo outras constantes).

A partir desta avaliação preliminar das variáveis envolvidas na extração de rutina, estas foram otimizadas utilizando um plano com 2 etapas. Inicialmente, aplicou-se uma metodologia RSM para otimizar as variáveis  $t$ ,  $T$  e  $S$  de modo a maximizar a extração de rutina com diferentes modelos estatísticos (*CCCD* e *FFD*); e, na segunda etapa, otimizou-se a *razão S/L* através de uma análise dose-resposta nas condições ótimas previamente determinadas.

#### 3.2.2.1. RSM baseada no *CCCD* com três variáveis

Inicialmente, foi utilizado um modelo RSM com base na abordagem estatística *CCCD* para tentar otimizar as condições das variáveis  $t$ ,  $T$  e  $S$ . A Tabela 2.2 apresenta uma descrição detalhada dos valores codificados e naturais para os intervalos selecionados das variáveis testadas. Os resultados obtidos apresentam-se na parte A da Tabela 3.2.

**Tabela 3.2.** A parte A exibe os resultados RSM da *CCCD* para a primeira abordagem na otimização das três variáveis principais envolvidas ( $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$ ). A parte B mostra os resultados *RSM* do *FFD* para a otimização das duas variáveis ( $X_1$  e  $X_2$ ) de extração envolvidas (variáveis, valores naturais e intervalos). Foram realizadas três repetições ( $r_{1-3}$ ) para cada condição.

Valor das variáveis (codificadas e naturais)			Rendimento - Rutina (mg/g dw)		
$X_1$ (t)	$X_2$ (T)	$X_3$ (S)	$r_1$	$r_2$	$r_3$
<b>A) Planejamento composto central circunscrito (CCCD)</b>					
-1(54,3)	-1(42,2)	-1(20,3)	4,03	3,86	3,94
1(125,7)	-1(42,2)	-1(20,3)	3,31	3,17	3,24
-1(54,3)	1(77,9)	-1(20,3)	1,25	1,14	1,19
1(125,7)	1(77,9)	-1(20,3)	0,68	0,68	0,68
-1(54,3)	-1(42,2)	1(79,8)	4,62	4,57	4,60
1(125,7)	-1(42,2)	1(79,8)	3,73	3,68	3,71
-1(54,3)	1(77,9)	1(79,8)	5,12	5,12	5,12
1(125,7)	1(77,9)	1(79,8)	5,23	5,23	5,23
-1.68(30)	0(60)	0(50)	1,41	1,33	1,37
1.68(150)	0(60)	0(50)	1,17	1,17	1,17
0(90)	-1.68(30)	0(50)	4,32	4,28	4,30
0(90)	1.68(90)	0(50)	4,63	4,63	4,63
0(90)	0(60)	-1.68(0)	3,88	3,89	3,88
0(90)	0(60)	1.68(100)	5,31	5,30	5,30
0(90)	0(60)	0(50)	1,79	1,79	1,79
0(90)	0(60)	0(50)	1,42	1,42	1,42
0(90)	0(60)	0(50)	1,61	1,61	1,61
0(90)	0(60)	0(50)	1,61	1,61	1,61
<b>B) Planejamento fatorial completo (FFD)</b>					
-2(20)	-1,68(30)	--	2,58	2,58	2,58
-2(20)	0(60)	--	4,70	4,70	4,70
-2(20)	1,68(90)	--	5,28	5,29	5,28
-1(55)	-1,68(30)	--	2,97	2,97	2,97
-1(55)	0(60)	--	5,23	5,23	5,23
-1(55)	1,68(90)	--	5,18	5,19	5,19
0(90)	-1,68(30)	--	3,44	3,43	3,44
0(90)	0(60)	--	5,23	5,23	5,23
0(90)	1,68(90)	--	5,19	5,18	5,19

Ajustando os resultados obtidos com a Eq.[10] através do procedimento não linear dos mínimos quadrados, obtiveram-se os valores paramétricos, os intervalos paramétricos e os critérios estatísticos numéricos que se apresentam na primeira parte da Tabela 3.3. As variações de intervalo com valores ( $\alpha=0,05$ ) maiores do que o valor do parâmetro foram consideradas não significativas (ns) e rejeitadas para análise posterior. Como exemplo da concordância entre os resultados previstos e os experimentais, verificou-se que os coeficientes de correlação foram, em todos os casos, superiores a 0,97 ( $R^2=0,9808$  e  $R^2_{adj}=0,9726$ ).

**Tabela 3.3** Resultados paramétricos da equação polinomial de segunda ordem (Eq.[10]) de acordo com *CCCD* com 5 níveis de intervalo (parte A) e *FFD* com 3 níveis de intervalo (parte B). Os subscritos paramétricos 1, 2 e 3 são os das variáveis envolvidas *t*, *T* e *S*, respetivamente. A análise de significância dos parâmetros ( $\alpha=0,05$ ) é apresentada em valores naturais. Além disso, apresenta-se a informação estatística do procedimento de ajuste do modelo.

Coeficientes		Resposta	
		<i>CCCD</i>	<i>FFD</i>
<b>Coeficientes de ajuste obtidos</b>			
<i>Interceptar</i>	$b_0$	4,21±0,08	5,47±0,08
	$b_1$	<i>ns</i>	-0,01±0,04
<i>Efeito linear</i>	$b_2$	0,80±0,06	-0,05±0,04
	$b_3$	0,88±0,06	
	$b_{11}$	-0,62±0,05	-0,44±0,03
<i>Efeito quadrático</i>	$b_{22}$	-0,54±0,05	-0,39±0,07
	$b_{33}$	-0,19±0,05	
	$b_{12}$	-0,21±0,07	-0,15±0,05
<i>Efeito interativo</i>	$b_{13}$	<i>ns</i>	
	$b_{23}$	<i>ns</i>	
<b>Informação estatística da análise do ajuste</b>			
	<i>Obs</i>	60	27
	<i>df</i>	51	20
	$R^2$	0,9808	0,9732
	$R^2_{adj}$	0,9726	0,9587
	<i>MEC</i>	0,12	6810,2
	<i>RMSE</i>	0,34	82,5
	<i>MAPE</i>	2,52	3,24
	<i>DW</i>	2,33	2,15
<i>ns</i> : coeficiente não significativo; $R^2$ : coeficiente de correlação; $R^2_{adj}$ : O coeficiente de determinação ajustado para o modelo; <i>MSE</i> : O erro quadrático médio; <i>RMSE</i> : A raiz quadrada da média dos erros; <i>MAPE</i> : O erro percentual médio absoluto; e <i>DW</i> : A estatística Durbin -Watson.			

Como resultado, a extração de rutina pode ser descrita de forma estatisticamente consistente, com a equação polinomial [10] e os parâmetros apresentados na Tabela 3.3 (parte A) em função das variáveis *t*, *T* e *S*:

$$Y_{CCCD} = 4,21 + 0,80T + 0,88S - 0,62t^2 - 0,54T^2 - 0,19S^2 - 0,21tT \quad (14)$$

A Eq.[14] traduz os padrões de resposta para cada variável de extração e apresenta efeitos do tipo linear, quadrático e interativo com fatores importantes e significativos. A parte A da Figura 3.2 apresenta a combinação de duas variáveis para o sistema de três variáveis num formato de resposta tridimensional prevista pela Eq.[14] para o rendimento de extração de rutina. Para cada gráfico, a variável excluída está posicionada no centro do domínio

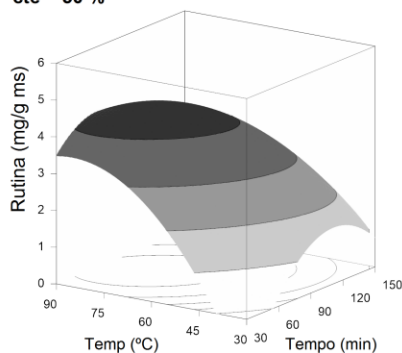
experimental ( $t=90$  min,  $T=60$  °C e  $S=50$  %). Em quase todas as respostas 3D produzidas, a quantidade de material extraído aumenta para um valor ótimo e, em seguida, diminui em função de cada uma das variáveis independentes avaliadas.

Consequentemente pode calcular-se um único ponto ao longo da resposta que conduziria a um máximo absoluto, permitindo calcular as condições ótimas que maximizam a extração de rutina. Através da aplicação de um procedimento simples, com restrições para os intervalos experimentais, são encontradas as condições ótimas bem como os valores de resposta máxima. Deste modo, as condições ótimas encontradas foram  $85,27 \pm 15,2$  min,  $73,7 \pm 18,1$  °C e  $100,0 \pm 2,2$  % de 1,2-propanodiol, produzindo um valor máximo de resposta de  $5,46 \pm 1,77$  mg/g dw de rutina.

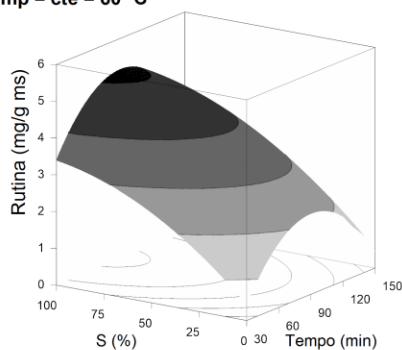
Apesar de se obterem conclusões relevantes a partir desta primeira abordagem RSM, o facto do ótimo da variável  $S$  estar localizado no valor máximo da gama da variável testada, faz com que o ótimo preditivo das outras duas variáveis e o máximo preditivo de rutina sejam menos fiáveis com altos intervalos de confiança e valores altamente dependentes das variações das outras duas variáveis. Portanto, para superar esta questão, propôs-se um outro modelo RSM complementar, em torno dos intervalos que aparentam ser os ótimos, com o objetivo de encontrar os valores experimentais que ajudariam a encontrar os ótimos fiáveis das variáveis  $t$  e  $T$ , e, em consequência máxima o rendimento fiável para a extração de rutina.

### A: CCCD ANÁLISE CONJUNTA

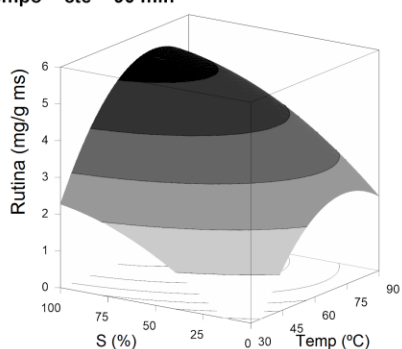
S = cte = 50 %



Temp = cte = 60 °C

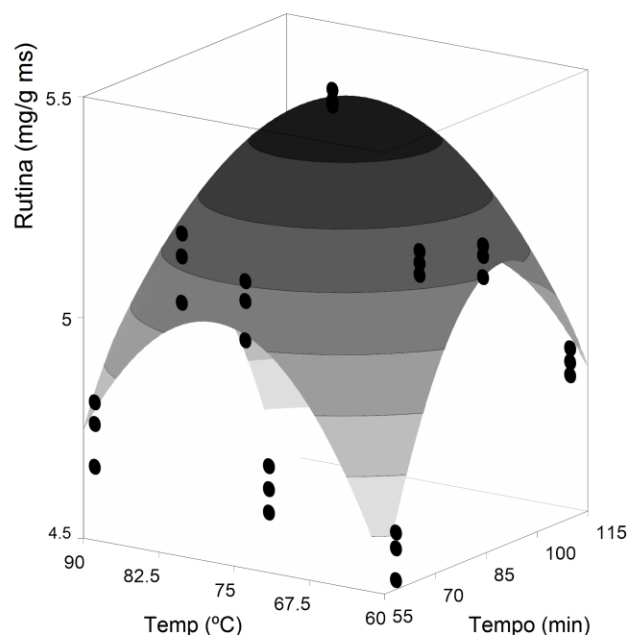


Tempo = cte = 90 min

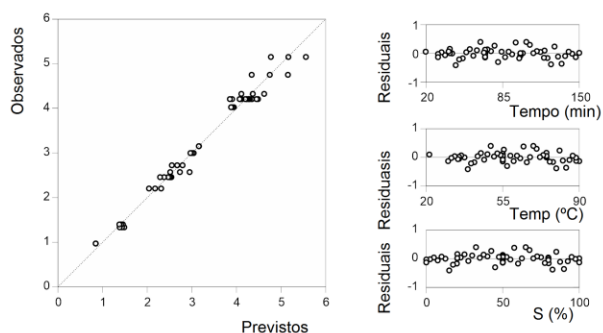


### B: FFD ANÁLISE CONJUNTA

S = cte = 100 %



### C: DISTRIBUIÇÃO ESTATÍSTICA



**Figura 3.2.** Mostra os resultados dos gráficos e a análise estatística do comportamento da extração de rutina para a abordagem *CCCD* e *FFD* em relação à razão *S/L* de 30 g/L.

#### 3.2.2.2. RSM baseado em FFD com as variáveis *t* e *T*.

Realizaram-se experiências adicionais utilizando um modelo RSM com base numa abordagem *FFD* para a análise específica da interação entre as variáveis *t* e *T*. Os intervalos das variáveis *t* e *T* para a abordagem *FFD* foram selecionados de acordo com os resultados obtidos por *CCCD* (domínio experimental na segunda parte da Tabela 2.2). Os resultados obtidos apresentam-se na parte B da Tabela 3.2. De modo idêntico à abordagem RSM anterior, a Eq. [10] foi utilizada de modo a ajustar os resultados experimentais através de um procedimento não-linear dos mínimos quadrados.

Os valores paramétricos, os intervalos paramétricos e os critérios estatísticos numéricos estimados foram obtidos e apresentados na parte B da Tabela 3.3. Os coeficientes de correlação obtidos foram  $R^2=0,9732$  e  $R^2_{adj}=0,9587$ , demonstrando uma concordância satisfatória entre as previsões e os resultados experimentais. O modelo matemático que controla o comportamento da extração de rutina, em função das variáveis  $t$  e  $T$ , foi desenvolvido de acordo com a Eq. [10] como se segue:

$$Y_{FFD} = 5,47 - 0,01t - 0,05T - 0,44t^2 - 0,39T^2 - 0,15tT \quad (15)$$

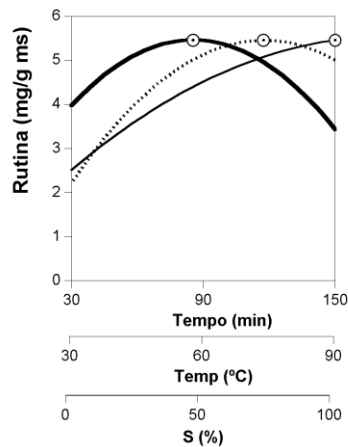
Nesta equação encontram-se cenários semelhantes aos obtidos anteriormente na abordagem *CCCD*, para as variáveis  $t$  e  $T$ . A parte A da Figura 3.2 mostra a combinação da resposta tridimensional das variáveis  $t$  e  $T$  prevista pela Eq.[15] para o rendimento de extração de rutina, produzindo um ótimo bem definido. Aplicando um procedimento simples, encontram-se as condições ótimas que conduzem ao rendimento máximo de extração de rutina. As condições ótimas absolutas encontradas foram  $84,88 \pm 4,1$  min e  $74,3 \pm 5,1$  °C produzindo um valor de rendimento máximo de resposta de  $5,47 \pm 0,37$  mg/g dw de rutina. É de notar que os valores são muito próximos aos valores encontrados anteriormente pela abordagem *CCCD*, mas os intervalos de confiança da resposta e as condições são muito mais fiáveis.

### 3.2.2.3. Condições numéricas ótimas que maximizam a extração e análise estatística

Ao combinar a informação produzida a partir das abordagens *CCCD* e *FFD*, o comportamento completo de cada variável relevante na extração de rutina fica definido em termos absolutos. Para todas as técnicas, as condições que conduzem aos valores ótimos foram reexaminadas com o intuito de garantir a precisão dos resultados apresentados. A Figura 3.3 mostra o resumo das respostas individuais 2D como uma função das variáveis definidas de modo a orientar a seleção das condições mais favoráveis. A linha representa o padrão de resposta variável quando os outros estão localizados nos valores ótimos previamente definidos. Os pontos  $\odot$  apresentados junto de cada linha destacam a localização do valor ótimo.

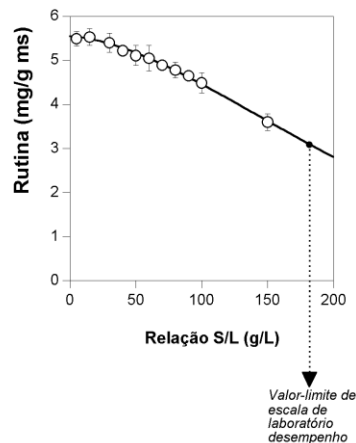
Para a obtenção dos resultados experimentais obtidos na Tabela 3.4 foi necessária uma descrição mais detalhada da metodologia matemática do planeamento experimental. Essa informação encontra-se descrita no Anexo C.

### A: Interação de $t$ , $T$ e $S$

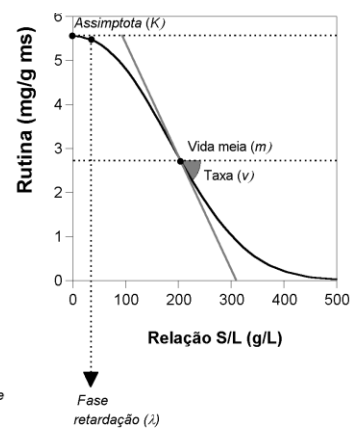


### B: Dose-resposta da relação $S/L$

#### B1: Análise dose-resposta



#### B2: Parâmetros e padrão previsto



**Figura 3.3.** *Parte A:* Mostra as respostas interativas 2D individuais para cada variável quando a razão  $S/L$  é 30 g/L. A linha representa a resposta da variável quando as outras estão posicionadas nas condições ótimas encontradas (5,54 mg/g dw,  $t=85$  min,  $T=75$  °C e  $S=100$  %). Os pontos (⊙) apresentados junto de cada linha destacam a localização do valor ótimo. A linha mais grossa mostra o padrão de tempo ( $t$ ), a linha pontilhada o padrão de temperatura ( $T$ ) e a fina o padrão da proporção solvente ( $S$ ). As linhas e os pontos são gerados pela combinação dos modelos polinomiais de segunda ordem das Eqs.[14] e [15]. Os valores de ajuste paramétricos obtidos são apresentados na Tabela 3.3. *Parte B:* A Figura 3.3B1 mostra a dose de resposta da razão  $S/L$  ( $X_4$ ) para os valores ótimos das outras três variáveis ( $t=85$  min,  $T=75$  °C e  $S=100$  %). Os pontos (○) representam os resultados experimentais obtidos (Tabela 3.4), enquanto a linha mostra o padrão previsto pelo modelo teórico da Eq.[16] (no anexo C). O valor limite (~175 g/L) mostra a concentração máxima experimental alcançável até que a amostra não possa ser fisicamente agitada à escala laboratorial. A Tabela 3.3B2 mostra os padrões previstos da análise da razão  $S/L$  efetuada pela Eq.[11] numa escala maior do que a testada experimentalmente. Os pontos (●) destacam as determinações paramétricas.

#### 3.2.3 Análise da dose-resposta da razão sólido/líquido nas condições ótimas de $t$ , $T$ e $S$ .

A Eq.[11] é utilizada para descrever os resultados encontrados do efeito da dose-resposta da variável razão  $S/L$ , para os valores ótimos das outras três variáveis ( $t=85$  min,  $T=75$  °C e  $S=100$  %). Os resultados experimentais são apresentados na Tabela 3.4, enquanto a parte B da Figura 3.3 mostra a ilustração gráfica dos resultados e do procedimento de ajuste efetuado.

Na Figura 3.3B1, os pontos (○) representam os efeitos da dose-resposta experimental da razão  $S/L$  e a linha apresenta o padrão previsto pelo modelo da Eq.[11]. Os valores paramétricos da Eq. [11], obtidos pelo ajuste da equação aos seguintes resultados experimentais, são:  $K=5,54\pm 0,12$  mg/g dw de rutina;  $m=201,9\pm 13,1$  g/L e  $a=1,65\pm 0,12$ . Os valores paramétricos adicionais obtidos pelas Eqs.[12] e [13] foram  $v=0,015\pm 0,001$  mg/g dw de rutina que não é extraída por cada g/L da razão  $S/L$  aumentada e  $\lambda=20,4\pm 3,5$  g/L.

Obtiveram-se os coeficientes de correlação  $R^2=0,9935$  e  $R^2_{adj}=0,9935$ . Adicionalmente, na Figura 3.3B1 destaca-se um ponto (●) que descreve o valor limite encontrado experimentalmente (~175 g/L), conceitualmente semelhante ao "ponto de saturação", no qual é possível obter valores mais elevados atingíveis à escala laboratorial.

Na Figura 3.3B2 apresenta-se a ilustração dos parâmetros previstos e os padrões de análise da razão  $S/L$  efetuada pela Eq. [11] num intervalo superior ao experimentalmente testado. Os pontos (●) destacam as determinações paramétricas e a sua implicação na resposta de extração de rutina em função da razão  $S/L$ : (1) valor assintótico de  $K$  (5,54 mg/g dw de rutina) que indica o valor máximo de extração de rutina alcançável; (2) o valor da fase de atraso ( $\lambda=20,4$  g/L) que mostra o ponto em que as diferenças dos valores de extração de rutina (mg/g de peso seco) são estatisticamente significativos, portanto pode ser considerado como o valor inicial para o qual o solvente não é capaz de extrair a mesma quantidade de rutina; (3) o valor da semi-vida ( $m=201,9$  g/L) que apresenta a dose requerida para 50 % de resposta; e (4) o valor da frequência ( $\nu$ ) calculado no valor da semi-vida que indica que a taxa média do processo é de 0,015, na qual os valores de extração de rutina (mg/g dw) começam a diminuir por cada g/L de razão  $S/L$  aumentado, após o valor da fase de atraso.

**Tabela 3.4.** Valores de extração de rutina em função da razão sólido-líquido ( $X_4$ , razão  $S/L$ ) nas condições ótimas de tempo ( $X_1$ ,  $t=85$  min), temperatura ( $X_2$ ,  $T=75$  °C) e proporção de solvente ( $X_3$ ,  $S=100$  %). Foram efetuadas três repetições ( $r_{1-3}$ ) para cada condição.

Razão $S/L$ ( $X_4$ , g/L)	Resposta		
	$r_1$ (mg/g dw)	$r_2$ (mg/g dw)	$r_3$ (mg/g dw)
5	5,18	5,17	5,18
15	5,57	5,57	5,57
30	5,40	5,40	5,40
40	5,22	5,22	5,22
50	5,12	5,09	5,10
60	5,04	5,05	5,05
70	4,89	4,89	4,89
80	4,77	4,78	4,78
90	4,65	4,65	4,65
100	4,49	4,50	4,49
150	3,60	3,60	3,60

### 3.3. Avaliação da bioatividade e toxicidade

Finalmente, foi avaliada a atividade antioxidante e a citotoxicidade dos extratos obtidos nas condições ótimas de extração de rutina (1,2-propanodiol puro (100 %), a uma temperatura de extração de 75 °C, durante 85 minutos com uma razão sólido líquido de 15 g/L).

#### 3.3.1. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do extrato de *A. acutifolius* foi avaliada através de quatro ensaios *in vitro*: efeito captador de radicais livres (DPPH), poder redutor e inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno e inibição da peroxidação lipídica (TBARS). Os resultados obtidos nos diferentes ensaios, expressos em EC<sub>50</sub>, são apresentados na Tabela 3.5.

**Tabela 3.5.** Resultados obtidos da atividade antioxidante (valores de EC<sub>50</sub> em mg/mL) para 1,2-propanodiol e MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20, v/v).

Ensaio <i>in vitro</i>	1,2-Propanodiol (100%)	MeOH:H <sub>2</sub> O (80:20, v/v)	Valor de <i>p</i> teste <i>t</i> -Student
Efeito captador de radicais livres (DPPH)	6,51±0,55	4,94±0,29	<0,0001
Poder redutor	2,02±0,09	2,46±0,05	<0,0001
Inibição da descoloração do $\beta$ -caroteno	2,19±0,74	0,90±0,10	<0,0001
Inibição da peroxidação lipídica	7,35±1,45	1,58±0,23	<0,0001

Valores de EC<sub>50</sub> (Média±SD): Concentração de amostra correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor. Valores de EC<sub>50</sub> para o Trolox (controlo positivo): 41  $\mu$ g/mL (poder redutor), 42  $\mu$ g/mL (atividade captadora DPPH), 18  $\mu$ g/mL (inibição da descoloração  $\beta$ - caroteno) e 23  $\mu$ g/mL (inibição da peroxidação lipídica, TBARS).

Através da análise dos dados da tabela é possível verificar que os valores de EC<sub>50</sub> variam de 2,02 a 7,35 mg/mL e de 0,90 a 4,94 mg/mL para os ensaios de 1,2-propanodiol e MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20, v/v), respetivamente. Tendo em conta os resultados obtidos, verifica-se diferença estatisticamente significativa em todos os ensaios de atividade antioxidante (efeito captador de radicais livres, poder redutor, inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno e inibição da peroxidação lipídica), relativamente aos solventes avaliados. A extração efetuada com MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) exibiu melhor potencial antioxidante, ou seja, os valores de EC<sub>50</sub> mais baixos para os ensaios do efeito captador de radicais livres (4,94 mg/mL), inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno (0,90 mg/mL) e inibição da peroxidação lipídica (1,58 mg/mL). De outro modo, a extração efetuada com 1,2-propanodiol mostrou maior potencial antioxidante no ensaio de poder redutor, apresentando valores de 2,02 mg/mL.

### *3.3.2. Hepatotoxicidade*

Os resultados da citotoxicidade em células normais relevam que o solvente 1,2-propanodiol (100 %) apresenta toxicidade, pelo que o extrato (dissolvido no solvente) também apresenta. No entanto, se utilizarmos o solvente 1,2-propanodiol numa concentração máxima de 25 % (75 % de água) a percentagem de inibição é inferior a 50 %, ou seja, apresenta muito menor toxicidade. A amostra utilizada para estudo, foi preparada com 8 mg de planta seca/mL de solvente, que corresponde a 3,09 mg de rutina.

## Capítulo 4. Conclusões e trabalho futuro

Estudos disponíveis na literatura demonstraram a capacidade de um conjunto alargado de solventes eutéticos de extrair compostos fenólicos a partir de matrizes vegetais. Neste contexto, a utilização destes solventes poderá reduzir problemas de toxicidade associados à extração com solventes orgânicos convencionais. Neste trabalho foram testados cinco DES, fixando as restantes variáveis de extração ( $t=1$  h,  $T=30$  °C, razão  $S/L=30$  g/L), obtendo-se o melhor rendimento de extração de rutina (4,84 mg/g) com o solvente 1,2-propanodiol:CC, contendo 20 % de água. Este valor é muito próximo do valor obtido com o solvente convencional, metanol:água (4,77 mg/g).

Dado que os álcoois seleccionados neste trabalho são líquidos à temperatura ambiente, para efeitos de comparação, foi testada ainda a sua utilização como solventes puros ou com 20 % de água. E, de facto, verificou-se que os solventes com maior eficiência de extração da rutina foram o etileno glicol puro e as misturas 1,2-propanodiol:H<sub>2</sub>O (20 %, w/w) e etileno glicol:H<sub>2</sub>O (20 %, w/w). Ou seja, nas condições estudadas, a capacidade de extração destes álcoois foi superior a qualquer um dos DES estudados.

Numa segunda fase, foram estudadas as condições ótimas de extração utilizando 1,2-propanodiol através da metodologia de superfície de resposta, fazendo variar o tempo de extração, a temperatura, a proporção de solvente orgânico e a razão sólido-líquido. Obtiveram-se as seguintes condições ótimas: solvente 1,2-propanodiol ( $S$ , 100 %), temperatura de 75 °C, razão sólido-líquido 15 (g/L), durante 85 min de extração. Nestas condições, o rendimento de rutina foi de 5,54 mg/g.

Assim, no presente estudo, foi desenvolvido um método alternativo de extração por maceração de um composto bioativo maioritário (rutina) a partir de *A. acutifolius*.

Numa última fase, avaliou-se a atividade antioxidante do extrato obtido nas condições ótimas. Verificou-se que os valores de EC<sub>50</sub> do extrato revelaram menor atividade antioxidante, comparativamente com o resultado da extração através do método convencional, à exceção do poder redutor cuja extração efetuada com 1,2-propanodiol exibiu maior potencial

antioxidante. Este facto parece estar relacionado com a possível presença de outros compostos, que não os extraídos, uma vez que a concentração de rutina obtida com o 1,2-propanodiol foi maior.

Por fim, foi ainda avaliada a toxicidade em células normais de fígado de porco, cujo solvente 1,2-propanodiol (100 %) exhibe toxicidade, pelo que o extrato dissolvido no solvente também o apresenta. Assim, o solvente deve ser utilizado numa concentração máxima de 25 % de 1,2-propanodiol (75 % de água) uma vez que para esta proporção a percentagem de inibição é inferior a 50 %.

O método de HPLC revelou ser eficaz, com uma excelente precisão e recuperação, e foi aplicado com sucesso para a determinação da rutina presente nas amostras de *A. acutifolius*.

Na continuação deste trabalho, propõe-se como atividade futura estudar a capacidade de extração de compostos fenólicos utilizando solventes eutécticos formados por outras famílias de compostos bem como álcoois puros, avaliando no caso dos DES, o efeito da variação da razão molar dos respetivos componentes individuais. A extensão dos estudos de extração a outras matrizes vegetais com perfis fenólicos mais complexos poderá também fornecer informação importante sobre a seletividade destes solventes. Em paralelo, será ainda relevante efetuar estudos de estabilidade dos extratos nestes solventes. Por fim, seria interessante avaliar a aplicação complementar de técnicas de extração tais como micro-ondas, ultrassons, etc..

## Referências bibliográficas

- Abbott, A. P., G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed, V. Tambyrajah. 2003. “Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures.” *Chemical Communications*, no. 1, pp. 70–71, 2003.
- Amarowicz, Ryszard, Branka Rahimi-Moghaddam, Parvaneh Barl, J.A. Weil, R.B. Pegg. 2004. “Free-Radical Scavenging Capacity and Antioxidant Activity of Selected Plant Species from the Canadian Prairies.” *Food Chemistry* 84: 551–62.
- Antolovich, Michael, Paul D. Prenzler, Emilios Patsalides, Suzanne McDonald, Kevin Robards. 2001. “Methods for Testing Antioxidant Activity.” *The Analyst* 127: 183–98.
- Barros, Lillian, Montserrat Dueñas, Isabel C.F.R. Ferreira, Ana Maria Carvalho, Celestino Santos-Buelga. 2011. “Use of HPLC-DAD-ESI/MS to Profile Phenolic Compounds in Edible Wild Greens from Portugal.” *Food Chemistry* 127: 169–73.
- Bi, Wentao, Minglei Tian, Kyung Ho Row. 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.
- Box, George E.P., J. Stuart Hunter, William G. Hunter. 2005. *Statistics for Experimenters. Statistics for Experimenters: Design, Innovation and Discovery*. John Wiley & Sons.
- Bubalo, Marina Cvjetko, Natka Ćurko, Marina Tomašević, Karin Kovačević Ganić, Ivana Radojčić Redovniković. 2016. “Green Extraction of Grape Skin Phenolics by Using Deep Eutectic Solvents.” *Food Chemistry* 200: 159–66.

- Carocho, Márcio, Isabel 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.
- Chen, Fengli, Kailin Mo, Zhaizhi Liu, Fengjian Yang, Kexin Hou, Shuangyang Li, Yuangang Zu, Lei Yang. 2014. "Ionic Liquid-Based Vacuum Microwave-Assisted Extraction Followed by Macroporous Resin Enrichment for the Separation of the Three Glycosides Salicin, Hyperin and Rutin from *Populus* Bark." *Molecules* 19 (7): 9689–9711.
- Choi, Y.H., Spronsen, J. van, 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: 1701–1705.
- Chong, Zhao Zhong, Faqi Li, Kenneth Maiese. 2005. "Oxidative Stress in the Brain: Novel Cellular Targets That Govern Survival during Neurodegenerative Disease." *Progress in Neurobiology* 75 (3): 207–46.
- Comuzzi, Clara, Pierluigi Polese, Andrea Melchior, Roberto Portanova, Marilena Tolazzi. 2003. "SOLVERSTAT: A New Utility for Multipurpose Analysis. An Application to the Investigation of Dioxygenated Co(II) Complex Formation in Dimethylsulfoxide Solution." *Talanta* 59 (1): 67–80.
- Cui, Qi, Xiao Peng, Xiao-Hui Yao, Zuo-Fu Wei, Meng Luo, Wei Wang, Chun-Jian Zhao, Yu-Jie Fu, Yuan-Gang Zu. 2015. "Deep Eutectic Solvent-Based Microwave-Assisted Extraction of Genistin, Genistein and Apigenin from Pigeon Pea Roots." *Separation and Purification Technology* 150: 63–72.
- Dai, Jin, Russell J. Mumper. 2010. "Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties." *Molecules* 15 (10): 7313–52.
- Dai, Yuntao, Jaap van Spronsen, Geert-Jan Witkamp, Robert Verpoorte, Young Hae Choi. (2013a). "Natural Deep Eutectic Solvents as New Potential Media for Green Technology." *Analytica Chimica Acta* 766: 61–68.

- Dai, Yuntao, Geert-Jan Witkamp, Robert Verpoorte, Young Hae Choi. (2013b). "Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus Tinctorius L.*" *Analytical Chemistry* 85 (13): 6272–78.
- Dai, Y., Witkamp, G.-J., Verpoorte, R., Choi, Y.H.. 2015. "Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications." *Food Chem.* 187, 14–19.
- Fang, Xinsheng, Jianhua Wang, Jifu Hao, Xueke Li, Ning Guo. 2015. "Simultaneous Extraction, Identification and Quantification of Phenolic Compounds in *Eclipta Prostrata* Using Microwave-Assisted Extraction Combined with HPLC-DAD-ESI-MS/MS." *Food Chemistry* 188: 527–36.
- Fang, Yun-zhong, Sheng Yang, Guoyao Wu, PhD. 2002. "Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition." *Nutrition* 18 (02): 872–79.
- Gawlik-dziki, Urszula, Swieca Michał, Maciej Sułkowski, Dariusz Dziki, Barbara Baraniak, Jaroslaw Czyz. 2013. "Antioxidant and Anticancer Activities of *Chenopodium Quinoa* Leaves Extracts – In Vitro Study." *Food and Chemical Toxicology* 57: 154–60.
- Gong, Aiqin, Wenhui Ping, Jue Wang, Xiashi Zhu. 2014. "Cyclodextrin polymer/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanocomposites as Solid Phase Extraction Material Coupled with UV – Vis Spectrometry for the Analysis of Rutin." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 122: 331–36.
- Gu, Huiyan, Fengli Chen, Qiang Zhang, Jing Zang. 2016. "Application of Ionic Liquids in Vacuum Microwave-Assisted Extraction Followed by Macroporous Resin Isolation of Three Flavonoids Rutin, Hyperoside and Hesperidin from *Sorbus Tianschanica* Leaves." *Journal of Chromatography B* 1014: 45–55.
- Hayyan, Adeeb, Farouq S. Mjalli, Inas M. AlNashef, Yahya M. Al-Wahaibi, Talal Al-Wahaibi, Mohd Ali Hashim. 2013. "Glucose-Based Deep Eutectic Solvents: Physical Properties." *Journal of Molecular Liquids* 178: 137–41.
- Heleno, Sandrina A., Lillian Barros, Anabela Martins, Maria João Sousa, Isabel C.F.R. Ferreira. 2010. "Tocopherols Composition of Portuguese Wild Mushrooms with Antioxidant Capacity." *Food Chemistry*, no. 22 May 2016.

- Helena, Sandrina A., Patrícia Diz, M. A. Prieto, Lillian Barros, Alírio Rodrigues, Maria Filomena Barreiro, Isabel C.F.R. Ferreira. 2016. "Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction to Obtain Mycosterols from *Agaricus Bisporus L.* by Response Surface Methodology and Comparison with Conventional Soxhlet Extraction." *Food Chemistry* 197: 1054–63.
- Kemmer, Gerdi Christine, Sandro Keller. 2010. "Nonlinear Least-Squares Data Fitting in Excel Spreadsheets." *Nature Protocols* 5 (2): 267–81.
- Kraujalis, Paulius, Petras Rimantas Venskutonis, Elena Ibáñez, Miguel Herrero. 2015. "Optimization of Rutin Isolation from *Amaranthus Paniculatus* Leaves by High Pressure Extraction and Fractionation Techniques." *The Journal of Supercritical Fluids* 104: 234–42.
- Mikhail, S.Z., W.R. Kimel. 1961. "Densities and Viscosities of Methanol-Water Mixtures." *Journal of Chemical and Engineering Data* 6 (4): 533–37.
- Murado, Miguel Anxo García, Miguel Angel Prieto Lage. 2013. "NOEC and LOEC as Merely Concessive Expedients: Two Unambiguous Alternatives and Some Criteria to Maximize the Efficiency of Dose-Response Experimental Designs." *Science of the Total Environment* 461-462: 576–86.
- Murado, Miguel Anxo García, Miguel Angel Prieto Lage. 2013. "Dose-Response Analysis in the Joint Action of Two Effectors. A New Approach to Simulation, Identification and Modelling of Some Basic Interactions." *PLoS ONE* 8 (4).
- Nam, Min Woo, Jing Zhao, Min Sang Lee, Ji Hoon Jeong, Jeongmi Lee. 2015. "Enhanced Extraction of Bioactive Natural Products Using Tailor-Made Deep Eutectic Solvents: Application to Flavonoid Extraction from *Flos Sophorae*." *Green Chemistry* 17 (3): 1718–27.
- Paiva, Alexandre, Rita Craveiro, Ivo Aroso, Marta Martins, Rui L. Reis, Ana Rita C. Duarte. 2014. "Natural Deep Eutectic Solvents - Solvents for the 21st Century." *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 2 (5): 1063–71.

- Park, Ha Eun, Baokun Tang, Kyung Ho Row. 2014. "Application of Deep Eutectic Solvents as Additives in Ultrasonic Extraction of Two Phenolic Acids from *Herba Artemisiae Scopariae*." *Analytical Letters* 47 (9): 1476–84.
- Pena-Pereira, Francisco, Jacek Namieśnik. 2014. "Ionic Liquids and Deep Eutectic Mixtures: Sustainable Solvents for Extraction Processes." *ChemSusChem Reviews* 7 (7): 1784–1800.
- Peng, Xiao, Ming-Hui Duan, Xiao-Hui Yao, Yu-Hang Zhang, Chun-Jian Zhao, Yuan-Gang Zu, Yu-Jie Fu. 2016. "Green Extraction of Five Target Phenolic Acids from *Lonicerae Japonicae Flos* with Deep Eutectic Solvent." *Separation and Purification Technology* 157: 249–57.
- Pinela, José, M. A. Prieto, Maria Filomena Barreiro, Ana Maria Carvalho, M. Beatriz P.P. Oliveira, J.A. Vázquez, Isabel C.F.R. Ferreira. 2016. "Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Hydrophilic and Lipophilic Antioxidants from a Surplus Tomato Crop by Response Surface Methodology." *Food and Bioproducts Processing* 98: 283–98.
- Prikler, S. 2009. *Advanced Excel for Scientific Data Analysis*. 2nd ed. Robert de Levie Ed.
- Qi, Xiao-Lin, Xiao Peng, Yu-Yan Huang, Lu Li, Zuo-Fu Wei, Yuan-Gang Zu, Yu-Jie Fu. 2015. "Green and Efficient Extraction of Bioactive Flavonoids from *Equisetum Palustre L.* by Deep Eutectic Solvents-Based Negative Pressure Cavitation Method Combined with Macroporous Resin Enrichment." *Industrial Crops and Products* 70: 142–48.
- Qin, Hongying, Guangming Zhou, Guilong Peng, Junping Li, Junhua Chen. 2015. "Application of Ionic Liquid-Based Ultrasound-Assisted Extraction of Five Phenolic Compounds from Fig (*Ficus Carica L.*) for HPLC-UV." *Food Analytical Methods* 8: 1673–81.
- Reis, Filipa S., Sandrina A. Heleno, Lillian Barros, Maria João Sousa, Anabela Martins, Celestino Santos-Buelga, Isabel C.F.R. Ferreira. 2011. "Toward the Antioxidant and Chemical Characterization of Mycorrhizal Mushrooms from Northeast Portugal." *Food Chemistry* 76 (6): 824–30.
- Segur, Jb. 1953. *Physical Properties of Glycerine and Its Solutions*. *Aciscience.Org*.

- Tang, Baokun, Heng Zhang, Kyung Ho Row. 2015. "Application of Deep Eutectic Solvents in the Extraction and Separation of Target Compounds from Various Samples." *Journal of Separation Science* 38 (6): 883–1072.
- Valle, Lizette Gil del. 2011. "Oxidative Stress in Aging: Theoretical Outcomes and Clinical Evidences in Humans." *Biomedicine & Aging Pathology* 1: 1–7.
- Wei, Zuo-Fu, Xiaolin Qi, Tingting Li, Meng Luo, Wei Wang, Yuangang Zu, Yujie Fu. (2015a). "Application of Natural Deep Eutectic Solvents for Extraction and Determination of Phenolics in *Cajanus Cajan* Leaves by Ultra Performance Liquid Chromatography." *Separation and Purification Technology* 149: 237–44.
- Wei, Zuo-Fu, Xi-Qing Wang, Xiao Peng, Wei Wang, Chun-Jian Zhao, Yuan-Gang Zu, Yu-Jie Fu. (2015b). "Fast and Green Extraction and Separation of Main Bioactive Flavonoids from *Radix Scutellariae*." *Industrial Crops and Products* 63: 175–81.
- Weibull, W., Sweden, S., 1951. *A statistical distribution function of wide applicability*. J. Appl. Mech. 18, 293–297.
- Wu, Hongwei, Meilan Chen, Yunchang Fan, Fawzi Elsebaei, Yan Zhu. 2012. "Determination of Rutin and Quercetin in Chinese Herbal Medicine by Ionic Liquid-Based Pressurized Liquid Extraction–liquid Chromatography-Chemiluminescence Detection." *Talanta* 88: 222–29.
- Xie, Jie, Lixia Shi, Xingyi Zhu, Ping Wang, Yi Zhao, Weike Su. 2011. "Mechanochemical-Assisted Efficient Extraction of Rutin from *Hibiscus Mutabilis L.*" *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12: 146–52.
- Yadav, Anita, Shruti Trivedi, Rewa Rai, Siddharth Pandey. 2014. "Densities and Dynamic Viscosities of (Choline Chloride+glycerol) Deep Eutectic Solvent and Its Aqueous Mixtures in the Temperature Range (283.15-363.15) K." *Fluid Phase Equilibria* 367: 135–42.
- Yao, Xiao-Hui, Dong-yang Zhang, Ming-Hui Duan, Qi Cui, Wen-Jing Xu, Meng Luo, Chun-Ying Li, Yuan-Gang Zu, Yu-Jie Fu. 2015. "Preparation and Determination of Phenolic Compounds from *Pyrola Incarnata Fisch.* with a Green Polyols Based-Deep Eutectic Solvent." *Separation and Purification Technology* 149: 116–23.

- Zahra, Rastian, Mehranian Mehrnaz, Vahabzadeh Farzaneh, Sartavi Kohzad. 2007. "Antioxidant Activity of Extract from a Brown Alga, *Sargassum Boveanum*." *African Journal of Biotechnology* 6 (24): 2740–45.
- Zeng, Huan, Yuzhi Wang, Jinhuan Kong, Chan Nie, Ya Yuan. 2010. "Ionic Liquid-Based Microwave-Assisted Extraction of Rutin from Chinese Medicinal Plants." *Talanta* 83: 582–90.
- Zeng, Huan, Yuzhi Wang, Xiaojie Liu, Jinhuan Kong, Chan Nie. 2012. "Preparation of Molecular Imprinted Polymers Using Bi-Functional Monomer and Bi-Crosslinker for Solid-Phase Extraction of Rutin." *Talanta* 93: 172–81.
- Zhang, Qinghua, Karine de Oliveira Vigier, Sébastien Royer, François Jérôme. 2012. "Deep Eutectic Solvents: Syntheses, Properties and Applications." *Chem Soc Rev* 41 (21): 7108–46.
- Zhao, Chunjian, Zhicheng Lu, Chunying Li, Xin He, Zhao Li, Kunming Shi, Lei Yang, Yujie Fu, Yuangang Zu. 2014. "Optimization of Ionic Liquid Based Simultaneous Ultrasonic- and Microwave-Assisted Extraction of Rutin and Quercetin from Leaves of Velvetleaf (*Abutilon Theophrasti*) by Response Surface Methodology." *The Scientific World Journal* 2014: 11.

## Anexo A. Propriedades físicas dos solventes

Na Tabela A.1 é possível visualizar a viscosidade de cada solvente, a 20 °C e a 40 °C.

**Tabela A.1.** Viscosidade de alguns dos solventes utilizados neste trabalho.

Solvente (fração mássica de água)	Razão molar	Viscosidade/mPa·s	
		20 °C	40 °C
CC: glicerol (5 %)	1:2	200,5 <sup>e</sup>	60,2 <sup>b</sup>
CC: glicerol (20 %)	1:2	32,9 <sup>e</sup>	14,7 <sup>e</sup>
CC: glucose (7 %)	5:2	-	479,6 <sup>b</sup>
CC: glucose (20 %)	5:2	-	8,7 (25 %) <sup>g</sup>
CC: sacarose (7 %)	4:1	-	712,8 <sup>b</sup>
CC: sacarose (20 %)	4:1	-	-
Etilenoglicol puro	-	21,3	10
Etilenoglicol (20 %)	-	10,1	4,9
CC: 1,2-propanodiol (7 %)	1:1	-	35,7 <sup>b</sup>
CC: 1,2-propanodiol (20 %)	1:1	-	6,6 (25 %) <sup>g</sup>
1,2-propanodiol puro	-	66,9 <sup>a</sup>	18,3 <sup>a</sup>
CC:etilenoglicol (8 %)	1:1	-	-
CC:etilenoglicol (20 %)	1:1	-	-
1,2-propanodiol (20 %)	-	23,4 <sup>a</sup>	8,4 <sup>a</sup>
Glicerol (20 %)	-	60,1 <sup>d</sup>	20,8 <sup>d</sup>
Glicerol	-	1412 <sup>d</sup>	284 <sup>d</sup>
Água	-	1,0	0,992 <sup>b</sup>
Metanol (20 %)	-	1,0 <sup>f</sup>	0,7 <sup>f</sup>

<sup>a</sup>este trabalho;<sup>b</sup>(Dai et al. 2013a);<sup>c</sup>(Hayyan *et al.* 2013);<sup>d</sup>(Segur 1953);<sup>e</sup>(Yadav *et al.* 2014);<sup>f</sup>(Mikhail & Kimel 1961);<sup>g</sup>(Dai *et al.* 2015)

Na Tabela A.2 é possível visualizar a massa volúmica de cada solvente, a 20 °C e a 40 °C.

**Tabela A.2.** Massa volúmica dos solventes utilizados neste trabalho.

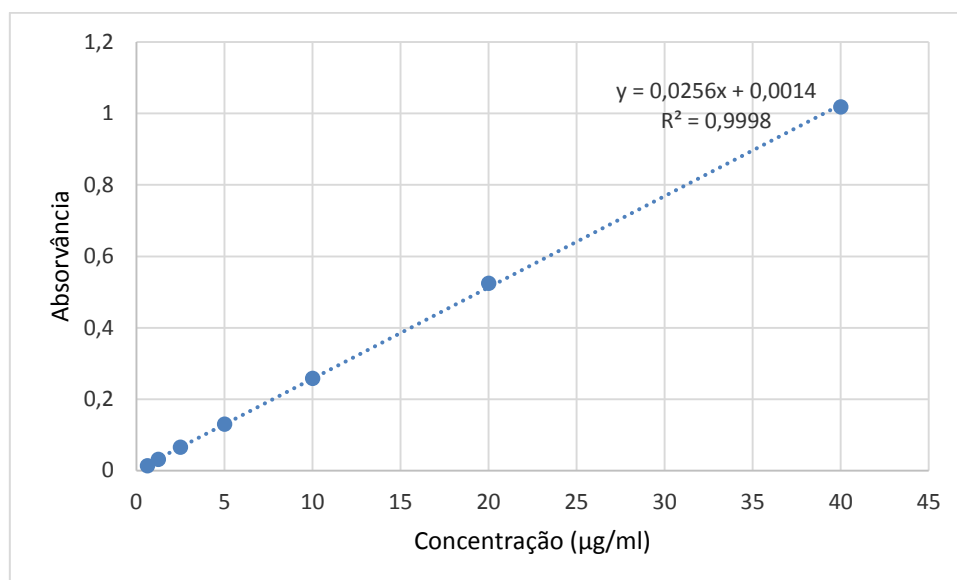
Solvente (fração mássica de água)	Razão molar	Massa volúmica (g/ml)	
		20 °C	40 °C
CC: glicerol (5 %)	1:2	1,1858 <sup>a</sup>	1,1742 <sup>b</sup>
CC: glicerol (20 %)	1:2	1,1570 <sup>a</sup>	1,1468 <sup>e</sup>
CC: glucose (7 %)	5:2	1,2161 <sup>a</sup>	1,2069 <sup>b</sup>
CC: glucose (20 %)	5:2	1,1852 <sup>a</sup>	-
CC: sacarose (7 %)	4:1	1,2320 <sup>a</sup>	1,2269 <sup>b</sup>
CC: sacarose (20 %)	4:1	1,2020 <sup>a</sup>	-
CC: 1,2-propanodiol (7 %)	1:1	1,0945 <sup>a</sup>	1,0833 <sup>b</sup>
CC: 1,2-propanodiol (20 %)	1:1	1,0863 <sup>a</sup>	-
Etilenoglicol puro	-	1,1132 <sup>a</sup>	1,0991 <sup>a</sup>

Etilenoglicol (20 %)	-	1,0978 <sup>a</sup>	1,0841 <sup>a</sup>
1,2-propanodiol puro	-	1,0370 <sup>a</sup>	1,0212 <sup>a</sup>
CC:etilenoglicol (8 %)	1:1	1,1156 <sup>a</sup>	1,1049 <sup>a</sup>
CC:etilenoglicol (20 %)	1:1	1,1028 <sup>a</sup>	1,0923 <sup>a</sup>
1,2-propanodiol (20 %)	-	1,0435 <sup>a</sup>	1,0285 <sup>a</sup>
Glicerol (20 %)	-	1,2007 <sup>a</sup>	1,0656 <sup>d</sup>
Glicerol	-	1,2613 <sup>a</sup>	1,2490 <sup>d</sup>
Água	-	0,9982 <sup>a</sup>	0,9922
Metanol (20 %)	-	0,8426 <sup>f</sup>	0,8291 <sup>f</sup>

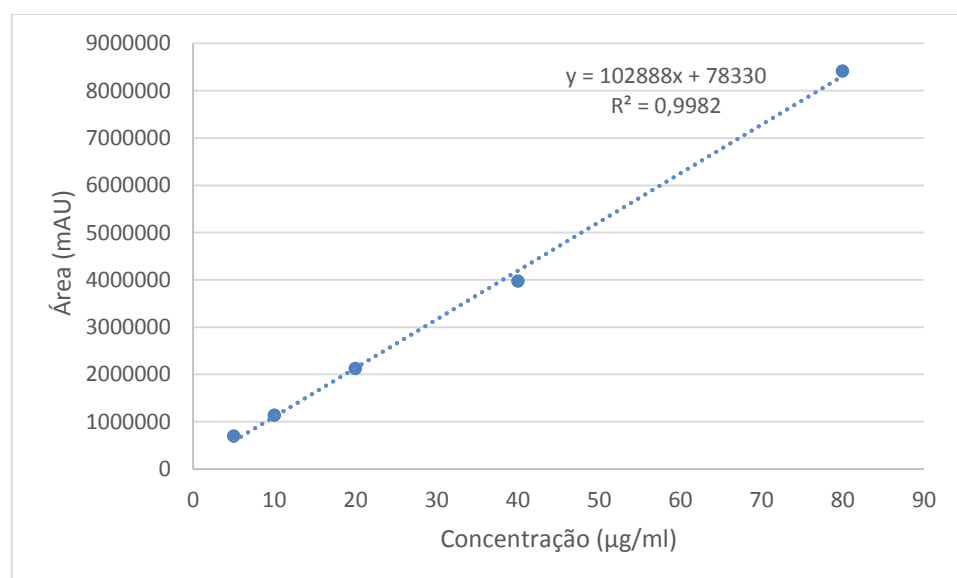
<sup>a</sup> este trabalho; <sup>b</sup> (Dai et al. 2013a); <sup>c</sup> (Hayyan *et al.* 2013); <sup>d</sup> (Segur 1953) ; <sup>e</sup> (Yadav *et al.* 2014); <sup>f</sup>(Mikhail & Kimel 1961)

Para alguns dos sistemas em que não foi possível encontrar informação na literatura sobre as suas propriedades físicas, efetuou-se a sua medição neste trabalho. A viscosidade foi medida utilizando um viscosímetro *VISCO STAR plus* da marca *Fungilab* e a massa volúmica foi medida num densímetro digital, modelo *DMA 5000* da marca *Anton-Paar*.

## Anexo B. Retas de calibração



**Figura B.1** Retas de calibração do 3-*O*-rutinósido de quercetina em MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) para UV-vis.



**Figura B.2** Retas de calibração do 3-*O*-rutinósido de quercetina em MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) para HPLC.

## Anexo C. Descrição da metodologia matemática do planeamento experimental

A descrição das expressões matemáticas para calcular a distribuição do modelo, decodificar e codificar os intervalos das variáveis testadas (apresentadas na Tabela 2.2) são encontradas seguidamente para o *planeamento fatorial completo (FFD)*, e o *planeamento composto central circunscrito (CCCD)*:

1) *Para o FFD:*

O número de experiências para  $n$  fatores  $k$  vem dado por  $n = 3^k$ . As variáveis foram codificadas de acordo com a seguinte equação:

$$X = (x_a - x_0) / \Delta x \quad (16)$$

Onde  $X$  é o valor codificado para as variáveis,  $x_a$  é o valor real correspondente,  $x_0$  é o valor real no centro do domínio, e  $\Delta x$  é o incremento de  $x_a$  que corresponde a uma variação de uma unidade de  $X$ .

2) *Para o CCCD:*

O número de repetições  $n_0$  do ponto central é calculado através das seguintes fórmulas para os fatores  $k$  com base na precisão uniforme:

$$\gamma = \frac{(k + 3) + \sqrt{9k^2 + 14k - 7}}{4(k + 2)} \text{ onde } n_0 = \text{floor} (\gamma(\sqrt{2^k} + 2)^2 - 2^k - 2k) \quad (17)$$

Onde *floor* designa o maior valor inteiro menor do que o argumento. O número de experiências para  $n$  fatores  $k$  vem dado por:

$$n = 2^k + 2k + 1 \quad (18)$$

As variáveis independentes dos valores codificados e naturais do *CCCD* são codificados e decodificados pelas seguintes expressões:

$$v_c = (v_n - v_0)/\Delta v_n \text{ e } v_n = v_0 + \Delta v_n \times v_c \quad (19)$$

Onde  $v_n$  e  $v_c$  são os valores naturais ( $n$ ) e ( $c$ ) dos codificados no centro do domínio experimental,  $v_0$  é o valor inicial e  $\Delta v_n$  é o incremento de  $v_n$  por unidade de  $v_c$ .