



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NA EXTRAÇÃO DE
COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NO RESÍDUO DO
ABACAXI (*Ananas comosus*)**

WILLYAN ARAÚJO DA COSTA

SAPIENTIA AEDIFICAT

**João Pessoa- PB,
2023.**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NA EXTRAÇÃO DE
COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NO RESÍDUO DO
ABACAXI (*Ananas comosus*)**

WILLYAN ARAÚJO DA COSTA*

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química (Área de Concentração: Química Analítica).

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Liliana de Fátima Bezerra Lira Pontes

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Edilene Dantas Teles Moreira

**Bolsista CAPES*

SAPIENTIA AEDIFICAT

**João Pessoa- PB,
2023.**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C838o Costa, Willyan Araújo da.

Obtenção, caracterização e aplicação de solventes eutéticos profundos na extração de compostos fenólicos presentes no resíduo do abacaxi (*Ananas comosus*) / Willyan Araújo da Costa. - João Pessoa, 2023.

108 f. : il.

Orientação: Líliliana de Fátima Bezerra Lira Pontes.

Coorientação: Edilene Dantas Teles Moreira.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN.

1. Química analítica. 2. Solventes verdes. 3. Compostos bioativos. 4. Compostos fenólicos. 5. Extração sólido-líquido. 6. Resíduos de abacaxi. I. Pontes, Líliliana de Fátima Bezerra Lira. II. Moreira, Edilene Dantas Teles. III. Título.

UFPB/BC

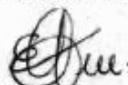
CDU 543 (043)

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NO RESÍDUO DO ABACAXI (*Ananas comosus*)

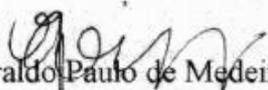
Tese de Doutorado apresentada pelo aluno Willyan Araújo da Costa e aprovada pela banca examinadora em 30 de outubro de 2023.



Profa. Dra. Liliansa de Fátima Bezerra Lira Pontes
DQ/UFPB
Orientadora/Presidente



Profa. Dra. Edilene Dantas Teles Moreira
DQ/UFPB/Areia-PB
Co-Orientadora



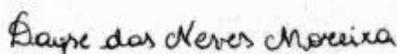
Dr. Everaldo Paulo de Medeiros
EMBRAPA/CG-PB
Examinador



Profa. Dra. Ana Paula Silveira Paim
DQ/UFPB
Examinadora



Prof. Dr. Sherlan Guimarães Lemos
DQ/UFPB
Examinador



Profa. Dra. Dayse das Neves Moreira
DQ/UFPB
Examinadora

*A Papai, Mamãe, Wendel e Jessicka,
dedico!*

Agradecimentos

Gostaria de iniciar meus agradecimentos destacando a importância de Deus, Jesus e da Espiritualidade Superior em minha vida. Acredito que, sem minha fé, nada eu poderia fazer pois, sempre que sinto que o chão sumiu, é por meio deles que me reconecto e retomo minha caminhada.

Em segundo lugar, gostaria de agradecer à minha família, a qual é composta por papai (Robson), mamãe (Ângela), meus dois irmãos (Wendel e Jessicka) e minha gata (Chica). Os esforços de nossos pais em nos proporcionar a chance de podermos ter os estudos como única prioridade de vida foram fundamentais para que, durante toda minha vida, eu tivesse o privilégio de ter a possibilidade de sonhar!

Também gostaria de agradecer às minhas primeiras amigas que fiz ao iniciar minha jornada durante este doutorado (Sarah, Vanessa e Layanny) pois acredito que sem elas eu não teria suportado os meus primeiros momentos de adaptação, a companhia de vocês foi o que me fortaleceu nos piores dias, meninas. Obrigado pelas risadas, desabafos e momentos de descontração regados à muito lanche e cafezinhos da tarde.

Dentro ainda dos agradecimentos aos amigos acadêmicos, gostaria de deixar destacado meus sinceros obrigados à Rossa, Fernanda, Dani e Renata, em vários momentos posso recordar o quão bem vocês me fizeram com as conversas trocadas e o respeito recíproco.

Gostaria de destacar meu muitíssimo obrigado à minha orientadora, Profa. Dra. Liliana Lira Pontes, por todo apoio prestado ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Sua confiança e respeito à minha forma de trabalhar, sobretudo após a primeira fase do trabalho, foram fundamentais para que eu pudesse chegar aonde cheguei. Obrigado pelos conselhos que levarei para a vida toda!

À minha coorientadora, Profa. Dra. Edilene Teles Moreira, gostaria de dizer que sou grato pelas experiências trocadas e por todo auxílio que me foi dado, principalmente na segunda fase deste trabalho.

Expresso aqui também meu agradecimento a todos os professores do PPgQ-UFPB, em especial aos professores: Márcio Coelho, Katia Bichinho, Antônia Lúcia e Claudio Gabriel. O Exemplo de vocês é algo que aprendi a admirar e pretendo demonstrar em minha ética profissional futura.

Agradeço aos laboratórios parceiros que abriram suas portas para que eu pudesse executar meus experimentos, sempre me respeitando e me acolhendo, sendo estes: Laboratório de Bioengenharia (LABIO – UFPB); Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB – UFRN); Laboratório de Engenharia de Petróleo (LAPET – UFPB) e o Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA – Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (UFPB)).

Às dependências do PPgQ/UFPB, agradeço o uso eventual de algum espaço físico mesmo que muito temporariamente.

À CAPES, agradeço pelo suporte financeiro dado pela bolsa que me foi concedida durante a execução de toda pesquisa.

No mais, agradeço ao Universo pela forma como as coisas acontecem em minha vida. Nada a reclamar, apenas agradecer e desejar que minha jornada continue tão linda e leve como tem sido até aqui!

*“...Se a minha intensidade ainda for me matar,
Eu prefiro ser poesia e ter histórias pra contar...”*
(Manu Gavassi, 2019).

Resumo

A busca por novos métodos analíticos é uma realidade na área da química analítica verde. Dentre as abordagens empregadas, destaca-se os usos de solventes verdes em substituição aos nocivos solventes orgânicos. Neste contexto, o uso de solventes eutéicos profundos (DESs) como uma alternativa tem recebido destaque. Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar as principais propriedades químicas, físico-químicas e ecotóxicas de sete diferentes DESs e posterior aplicação destes na extração, seguida da quantificação, dos compostos fenólicos presentes no resíduo do abacaxi (*Ananas comosus*). Na primeira etapa desta pesquisa, observou-se que a viscosidade dos DESs depende diretamente da estrutura de seus precursores e da capacidade de formação de diferentes interações intermoleculares. Com respeito à tensão superficial, esta seguiu a tendência da viscosidade, porém fortemente sensível à adição de água aos sistemas. O perfil reológico do solvente ChCaLa se mostrou sensível à adição de água uma vez que a adição de 10% desta levou o sistema a mudar sua configuração de fluido newtoniano para pseudo-plástico. Com respeito ao perfil ecotóxico, os solventes à base de HBDs ácidos apresentaram maior ação inibitória à germinação vegetal, tendo o ChGy apresentado a menor capacidade de inibição para a porção radicular e da raiz de sementes de alface. Em relação ao efeito bactericida dos DESs estudados, os mais hidrofílicos (PtGyLa e OcGyLa) apresentaram maior caráter nocivo, enquanto os solventes binários mostraram-se menos danosos à microbiota avaliada. Na segunda parte, são apresentados os resultados obtidos para a avaliação realizada quanto ao uso de solventes eutéicos profundos (DESs) ternários como agentes extratores de compostos fenólicos presentes em amostras de resíduos estudado, seguido da quantificação por espectrofotometria UV-Vis. Os dados dos ensaios preliminares apontaram que, o DES ChGuLa apresentou um melhor desempenho extrativo em termos de fenólicos totais ($109,30 \pm 9,06 \text{ mgEAG g}^{-1}_{\text{amostra}}$), sendo este resultado corroborado pelas avaliações das amostras sólidas, antes e após cada extração, por meio da quantificação de seus teores de lignina e de suas caracterizações por espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e microscopia de varredura eletrônica (MEV). Por fim, uma otimização do método extrativo foi realizada por meio de um delineamento composto central (DCC), onde as principais variáveis de processo (adição de água ao DES, tempo de extração, temperatura e massa de amostra) foram investigadas, sendo a melhor condição ($226,37 \pm 9,50 \text{ mgEAG g}^{-1}_{\text{amostra}}$), dentre as investigadas, aquela conduzida a 35% de adição de água, 3 mL de solvente, 65 °C, 0,15 g de amostra e durante 90 min. O resultado obtido na condição otimizada foi superior inclusive ao uso de uma tradicional solução hidroetanólica a 70% v v⁻¹ ($190,53 \pm 9,37 \text{ mgEAG g}^{-1}_{\text{amostra}}$), o que fomenta ainda mais a aplicabilidades dos DESs como agentes extratores.

Palavras-chaves: Solventes Verdes, Compostos Bioativos, Compostos Fenólicos, Extração Sólido-Líquido e Resíduos.

Abstract

The search for new analytical methods is a current reality in the analytical chemistry area. Among the applied approaches, the use of green solvents presents several highlights. In this context, the use of deep eutectic solvents (DESs) as an alternative have been receiving detach. Thus, the present work aimed to evaluate the mainly chemical, physical-chemical and ecotoxic properties of seven different DESs and to apply them for the extraction and quantification of phenolic compounds present in the pineapple (*Ananas comosus*) industrial waste. In the first stage, the results about the composition and their properties are presented. As result, it was observed that DESs viscosities is directly dependent on the precursor structures and intermolecular interactions. About the superficial tension, this property followed the same tendency of the viscosity, however, strongly sensitive to the water addition. The rheological profiles of the solvent ChCaLa showed to be sensitive to the water addition once an addition of 10% lead the system to change from a Newtonian to a pseudo-plastic. In relation to the ecotoxic profile, the solvents based on acid HBDs presented a superior inhibition capacity than others, been the ChGy presented the lower inhibition capacity. About the bactericide profile, the most hydrophobic DESs (PtGyLa and OcGyLa) presented the higher dangerous effect, while binaries systems presented the lower. In the second part, the results about the usage of ternary DESs as extractor agents of phenolic compounds from pineapple waste samples, followed by their quantification by spectrophotometry at UV-Vis region. The preliminary data showed that solvent ChGuLa presented the better extractive action, in terms of total phenolic content ($109.30 \pm 9.06 \text{ mgEAG g}^{-1}_{\text{sample}}$), been this result corroborated by the solid samples characterization in terms of its lignin content, Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscopy (SEM). At least, the developed method optimization was carried out by a central composite design (CCD), where the process main variables (water addition, extraction time, temperature, and sample mass) were investigated. The best condition ($226.37 \pm 9.50 \text{ mgEAG g}^{-1}_{\text{sample}}$) was achieved by the addition of 35% of water and a solvent volume of 3 mL for the extraction using 0.15 g of sample at 65 °C during 90 min, been this result superior to the obtained using a conventional hydroetanollic solution at 70% v v⁻¹ ($190.53 \pm 9.37 \text{ mgEAG g}^{-1}_{\text{sample}}$), what reinforce the usage of DESs as extractor agents.

Keywords: Green Solvents, Bioactive compounds, Phenolic Compounds, Solid-Liquid Extraction and Wastes.

~ Sumário ~

1. Introdução	18
1.1. Objetivos.....	22
1.1.1. Objetivo Geral	22
1.1.2. Objetivo Específicos.....	22
Capítulo 2 - Revisão da Literatura	24
2. Solventes eutéticos profundos: uma breve introdução	24
2.1. Histórico, fundamentos e características dos solventes eutéticos profundos.....	24
2.2. Solventes eutéticos profundos e seu comportamento ecotóxico.....	29
2.3. Uso de solventes eutéticos profundo no preparo de amostras	31
2.4. Compostos Fenólicos: uso de solventes eutéticos profundos em sua extração e quantificação.....	39
2.5. Matrizes lignocelulósicas como fontes alternativas de compostos fenólicos	43
Capítulo 3 – Avaliação Físico-química e Ecotóxica de Diferentes Solventes Eutéticos Profundos para Metodologias Analíticas Verdes	47
3. Materiais e Métodos	47
3.1. Reagentes e soluções	47
3.2. Obtenção dos DESs	47
3.3. Caracterização físico-química dos DESs e HDSs obtidos.....	48
3.3.1. Caracterização das propriedades estruturais.....	48
3.3.2. Caracterização do comportamento reológico	48
3.3.3. Determinação da tensão superficial.....	49
3.4. Avaliação do efeito ecotóxico.....	49
3.4.1. Ensaio de germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i>	49
3.4.2. Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH)	50
3.5. Avaliação da Capacidade Bactericida.....	50
3.6. Análise Estatística dos Dados	50
3.7. Resultados e Discussão.....	50
3.7.1. Caracterização Estrutural	50
3.7.2. Avaliação do Comportamento Reológico.....	54
3.7.3. Avaliação da Tensão Superficial	60
3.7.4. Avaliação do caráter fitotóxico.....	62
3.7.5. Avaliação da capacidade bactericida	66
Considerações Finais	68

Capítulo 4 – Uso de Solventes Eutéticos Profundos (DESs) Ternários na Extração de Compostos Fenólicos em Amostras de Resíduos de Abacaxi (<i>Ananas comosus</i>)	71
4. Materiais e Métodos	71
4.1. Coleta e pré-processamento das amostras de resíduo de abacaxi.....	71
4.2. Caracterização físico-química da amostra laboratorial.....	72
4.2.1. Determinação do potencial hidrogeniônico (pH) e do teor de sólidos solúveis.....	72
4.2.2. Determinação do teor de açúcares redutores totais livres.....	72
4.3. Preparo dos solventes eutéticos profundos (DESs)	72
4.4. Ensaios preliminares da extração sólido-líquido assistido por vórtex.....	73
4.5. Quantificação do teor de fenólicos totais nos extratos obtidos.....	73
4.6. Caracterização estrutural das amostras de resíduo de abacaxi antes e após as extrações preliminares	73
4.6.1. Determinação do teor de lignina Klason.....	74
4.6.2. Caracterização estrutural das amostras por espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	74
4.6.3. Caracterização por microscopia de varredura eletrônica (MEV)	74
4.7. Otimização estatística da extração de compostos fenólicos presentes nas amostras de resíduo de abacaxi.....	74
4.8. Análise estatística dos Dados.....	75
4.9. Resultados e Discussão.....	76
4.9.1. Caracterização preliminar da amostra de resíduo de abacaxi	76
4.9.2. Extrações e quantificações preliminares.....	77
4.9.3. Caracterização das amostras sólidas antes e após as extrações preliminares.....	79
4.9.4. Estudo da otimização da extração, seguida da quantificação, dos compostos fenólicos presentes na matriz amostral utilizando-se o DES ternário ChGuLa como agente extrator	86
Considerações Finais	93
Conclusão	94
REFERÊNCIAS.....	95

~ Lista de Figuras ~

Figura 1 - Os 12 princípios da Química Analítica Verde. Fonte: Autor.	19
Figura 2 - Estrutura molecular de algumas espécies químicas utilizadas no trabalho de Abbott et al. (2004). Fonte: Autor.	25
Figura 3 - Gráfico característico para formação de um sistema eutético binário. Fonte: Autor.	26
Figura 4 - Estrutura química de algumas moléculas tipicamente utilizadas na obtenção de solventes eutéticos profundos hidrofóbicos (HDES). Fonte: Makos, Slupek e Gebicki (2020) (ADAPTADO).	28
Figura 5 - Número de publicações sobre o uso de DES e HDES entre 2010 e 2023. Fonte: Banco de Buscas Web of Science.	29
Figura 6 - Etapas inerentes a qualquer procedimento de análise química. Fonte: Autor.	32
Figura 7 - Esquema sequencial de um processo de preparo de amostras por extração líquido-líquido (ELL). Fonte: Autor.	33
Figura 8 - Esquema sequencial de um processo de preparo de amostras por extração sólido-líquido (ESL). Fonte: Autor.	33
Figura 9 - Estrutura básica dos principais grupos de compostos fenólicos. Fonte: Sousa et al. (2020) (ADAPTADO). Nota: Os agrupamentos “R’s”, nas estruturas, denotam diferentes grupos substituintes que configuram cada composto fenólico em específico.	40
Figura 10 - Espectros de FTIR para os DESs ChGy (a) e ChU (b).	51
Figura 11 - Espectros de FTIR para os DESs ChLa (a); ChGuLa (b) e ChCaLa (b)...	52
Figura 12 - Espectros de FTIR para os HDESs PtGyLa (a) e OcGyLa (b).	53
Figura 13 - Perfis reológicos para os DESs ChGy (a) e ChU (b).	54
Figura 14 - Perfis reológicos para os DESs ChLa (a) e ChCaLa (b).	55
Figura 15 - Perfis reológicos para o DES ChGuLa (a) e o HDES PtGyLa/OcGyLa (b).	55
Figura 16 - Comportamento da tensão superficial em função da adição de água para os DESs investigados (a), tensão superficial dos HDESs e seus hidrocarbonetos precursores (b) e pH das soluções aquosas dos sistemas eutéticos obtidos. Nota: O símbolo (*) denota que há diferença estérica em relação ao relativo álcool precursor...	61

Figura 17 - Comportamento fitotóxico dos DESs ChGy (a) e ChU (b). Nota: O símbolo (*) indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle e "N.D" significa "Não Determinado" para os casos onde nenhum crescimento foi observado.....	63
Figura 18 - Comportamento fitotóxico dos DESs ChLa (a), ChCaLa (b) e ChGuLa (C). Nota: O símbolo (*) indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle e "N.D" significa "Não Determinado" para os casos onde nenhum crescimento foi observado.....	63
Figura 19 - Valores de IC ₅₀ calculados para os ensaios de fitotoxicidade. Nota: "N.D" significa "Não Determinado" para os casos onde nenhum crescimento foi observado..	64
Figura 20 - Principais etapas realizadas na elaboração do método de extração sólido-líquido e quantificação de compostos fenólicos presentes no resíduo de abacaxi. Fonte: Autor.....	76
Figura 21 - Resultados da quantificação do teor de fenólicos totais presentes nos extratos obtidos nas condições preliminares. Nota: Diferentes letras (a,b,c e d) indicam diferentes valores ($p < 0,05$).....	77
Figura 22 - Resultados da quantificação do teor e da remoção de lignina nas amostras de resíduo de abacaxi antes e após os ensaios preliminares de extração. Nota: Diferentes letras (a,b,c,d e e) indicam diferentes valores ($p < 0,05$).....	80
Figura 23 - Caracterização estrutural das amostras de resíduo do abacaxi por FTIR. ...	83
Figura 24 - Micrografias de varredura eletrônica para as amostras não tratadas (A) e após as extrações com EtOH (B), ChGuLa (C) e ChLa (D). Nota: Os índices 1,2 e 3 denotam as ampliações de 2500x, 1000x e 5130x, respectivamente.	84
Figura 25 - Gráfico de Pareto para a análise estatística dos dados do Delineamento Composto Central (DCC) realizado.	86
Figura 26 - Gráficos dos resíduos brutos versus os ensaios realizados de acordo com o Delineamento Composto Central (DCC).....	90
Figura 27 - Superfície de resposta (a) e gráfico de contornos (b) gerados a partir do modelo estatístico obtido.	91

~ Lista de Tabelas ~

Tabela 1 - Composição de solventes eutéticos profundos naturais (NADES) já reportados na literatura. Fonte: Radosevic et al. (2018) (ADAPTADO).	27
Tabela 2 - Composição química e molar dos solventes eutéticos estudados.....	48
Tabela 3 - Coeficientes da Lei de Potência de Ostwald de Waele* e respectivos ajustes para os solventes investigados. Nota: Para os solventes pós-adição de água, adotou-se a seguinte representação: sigla do solvente + percentual mássico de água adicionada. ...	57
Tabela 4 - Viscosidades médias mensuradas para os DESs e HDESs investigados nas diferentes condições	58
Tabela 5 - Resultados da concentração inibitória mínima (MIC) apresentada pelos diferentes sistemas eutéticos estudados.....	67
Tabela 6 - Matriz de experimentos do Delineamento Composto Central (DCC) realizado.....	75
Tabela 9 - Matriz de experimentos e resultados obtidos para o delineamento composto central (DCC).	87
Tabela 10 - ANOVA para o modelo de regressão obtido pelo Delineamento Composto Central (DCC) realizado.....	90

~ Lista de Abreviações ~

ARTL – Teor de Açúcares redutores totais livres;

ChCaLa – DES à base de Cloreto de Colina, Ácido Cítrico e Ácido Lático;

ChGuLa – DES à base de Cloreto de Colina, Glicose e Ácido Lático;

ChGy – DES à base de Cloreto de Colina e Glicerol;

ChLa - DES à base de Cloreto de Colina e Ácido Lático;

ChU - DES à base de Cloreto de Colina e Ureia;

DESS – Solventes Eutéticos Profundos (Do inglês *Deep Eutectic Solvents*);

EAG – Equivalente de Ácido Gálico;

HDESS – Solventes Euéticos Profundos Hidrofóbicos (Do inglês *Hydrophobic Deep Eutectic Solvents*);

IC₅₀ – Concentração capaz de promover uma inibição de 50% na germinação radicular ou da raiz do vegetal;

LOD – Limite de Detecção (Do inglês *Limit of Detection*);

LOQ – Limite de quantificação (Do inglês *Limit of Quantification*);

MIC – Concentração Inibitória Mínima para células bacterianas;

OcGyLa – HDES à base de Octanol, Glicerol e Ácido Lático;

PtGyLa – HDES à base de Pentanol, Glicerol e Ácido Lático;

RSD – Desvios Padrões Residuais (Do inglês *Residual Standard Deviation*).

~ CAPÍTULO 1 ~

Introdução

1. Introdução

Nas últimas décadas, tem sido observada uma crescente preocupação global acerca da necessidade de se explorar processos e métodos baseados no conceito da química verde. Tal fato se deve principalmente às inúmeras cobranças por parte da sociedade e entidades competentes quanto à urgência de se estabelecer um uso sustentável dos recursos naturais disponíveis e assim assegurar a existência de todos os ecossistemas do planeta Terra.

Neste sentido, destaca-se que o conceito de química verde foi utilizado pela primeira vez em 1998 quando Anastas e Warner (1998) [1] apresentaram o que seriam os 12 princípios norteadores para que um processo químico fosse considerado amigável do ponto de vista ambiental. Todavia, quando se fala nessa abordagem de química verde dentro do contexto da química analítica, tal aspecto vem sendo discutido desde quando Guardia e Ruzicka (1995) [2] pontuaram a importância da miniaturização dos processos analíticos como uma alternativa indispensável à adequação destes às questões ambientais tão discutidos desde os meados do século XX.

Em 2013, Galuszka et al. [3] fundamentaram os alicerces do conceito da química analítica verde ao estabelecerem o que viriam a ser os 12 princípios que levam à construção de métodos analíticos mais sustentáveis (**Figura 1**). Através desta formalização, foi proposta a predileção por análise *in situ* e direta, evitando-se ao máximo a necessidade de preparo de amostras. A mitigação do consumo de reagentes, bem como da geração de resíduos analíticos também figuraram como foco desta profunda discussão.

Apesar de todos esses princípios estarem bem fundamentados na literatura, é importante destacar que muitos ainda se encontram distantes de serem completamente aplicados, principalmente devido à restrição dos requisitos impostos pelas instrumentações analíticas disponíveis. Sendo assim, é importante destacar que a maioria das metodologias analíticas requer alguma(s) etapa(s) prévia(s) de preparo de amostras.

Dentre as várias etapas empregadas no preparo de amostras em química analítica, a extração apresenta-se como uma das mais amplamente utilizadas quando se deseja determinar constituintes em amostras. Dentre as técnicas extrativas, as do tipo líquido-líquido e sólido-líquido despontam como as mais amplamente utilizadas [4,5].

Preparar uma amostra para uma análise elementar, de especiação química ou determinação de compostos orgânicos exige, muitas vezes, o uso de misturas de solventes orgânicos voláteis. Para casos de especiação, onde as espécies químicas que compõem a amostra não são totalmente conhecidas, tem se usado, por exemplo, a extração com misturas de solventes como água/álcool ou clorofórmio. Assim, seja qual for o tipo de amostra (sólida, líquida ou gasosa), o uso de solventes em seu preparo pré-analítico é praticamente inevitável [6].

De uma forma geral, os protocolos analíticos amplamente utilizados fazem uso grandes volumes de solventes, em geral tóxicos, inflamáveis e de elevado custo, o que contraria os princípios 10, 11 e 12 da química analítica verde (**Figura 1**).

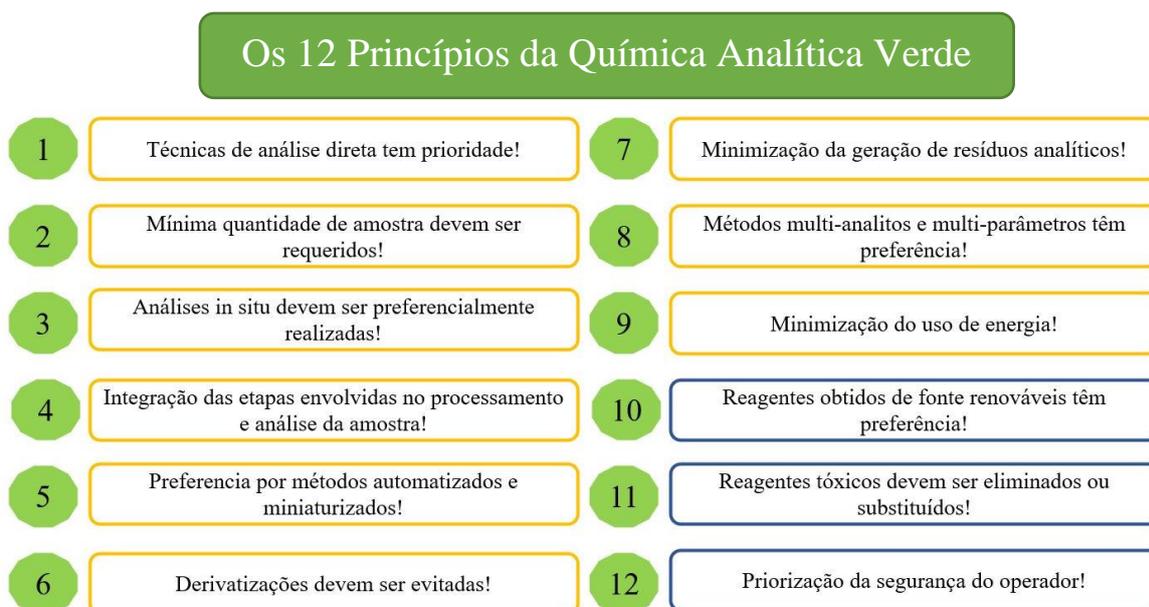


Figura 1 - Os 12 princípios da Química Analítica Verde. **Fonte:** Autor.

Alguns solventes orgânicos voláteis, entre os quais estão o etanol, o metanol e o clorofórmio, ainda têm sido bastante utilizados nos processos extrativos. O solvente extrator deve ser escolhido em função das características da matriz e das espécies a serem extraídas. No caso de amostras sólidas, por exemplo, podem ser usados ácidos ou solventes como diclorometano ou hexano [7]. O uso indiscriminado desses, e outros, solventes voláteis vêm recebendo críticas na literatura devido ao fato de apresentarem características indesejáveis, tais como sua severa toxicidade e inflamabilidade [6].

Nessa perspectiva, a escolha do solvente adequado se configura como um dos principais requisitos para obtenção de novos métodos de análise capazes de garantir

tanto a eficiência analítica quanto às demandas ambientais. É neste contexto que desponta o uso dos chamados solventes verde.

Uma classe de solventes verdes que tem ganhado bastante notoriedade no âmbito das abordagens ambientais é a dos chamados solventes eutéticos profundos (DESs). Os DESs surgiram na literatura por volta de 2004 através dos trabalhos realizados por Abbott et al. (2004) [8].

Do ponto de vista físico-químico, estes solventes são formados através do estabelecimento de ligações de hidrogênio entre as espécies precursoras, sendo uma denominada de aceptora da ligação de hidrogênio (HBA) e outra(s) como doadora(s) das ligações (HBD) [9].

Como principais características, os DESs apresentam uma baixa pressão de vapor, não são inflamáveis, boa estabilidade térmica e considerável, porém regulável, viscosidade [10–12]. Além disso, estes apresentam baixa toxicidade e boa biodegradabilidade frente aos tradicionais solventes orgânicos, comumente empregados em etapas de separação [13].

Quando obtidos a partir de metabólitos de ocorrência natural nos diversos seres vivos existentes, como álcoois, ácidos carboxílicos, aminoácidos, carboidratos e alguns lipídeos, os DESs recebem a nomenclatura especial de solventes eutéticos profundos naturais (NADESs), termo utilizado pela primeira vez no trabalho de Choi et al. (2011) [14].

Desde seu primeiro registro na literatura até os dias atuais, NADESs vêm sendo objeto de diversos estudos nas áreas de síntese orgânica e (bio)catálise, eletroanalítica, obtenção de novos materiais e em diferentes métodos de separação [15,16].

Outro cenário que vem apresentando forte tendência ao uso desta classe de solventes moleculares é o da chamada química (bio)analítica, a qual, pode ser definida como a área, da tradicional química analítica, voltada à quantificação e determinação de analitos que apresentam alguma propriedade relevante do ponto de vista bioquímico [17–21].

Falando-se em bioativos, é importante salientar que interesse da humanidade por esta classe de moléculas é historicamente datado desde as mais primitivas formas de sociedade, quando os primeiros indivíduos já manipulavam recursos naturais em busca de tratamentos de doenças e ferimentos. Nos últimos anos, dado o contexto da pandemia global da COVID-19 e de outras doenças endêmicas, muitos estudos vêm focando em

investigar a obtenção, quantificação e identificação destas espécies, tendo em vista sua possível atividade imunológica e/ou de combate direto a infecções virais e bacterianas [22–24].

Dentre as vastas classes de moléculas dotadas de atividades biológicas, a dos chamados compostos fenólicos tem figurado com uma das mais relevantes. Esta afirmação se deve ao fato destes apresentarem, para além de sua já conhecida atividade antioxidante [[21,24–26], a capacidade de atuarem como agentes antidiabéticos [27]; antimaláricos [28] e, mais recentemente, avaliados como benéficos ao combate da dengue, COVID-19 e outras doenças endêmicas emergentes [29–33].

Com base no acima reportado, a presente tese de doutorado objetivou a síntese, caracterização e avaliação do uso de solventes eutéticos profundos (DESs) bem como sua aplicação em procedimentos de extrações sólido-líquido visando à extração de compostos fenólicos presentes em amostras de resíduo de abacaxi (*Ananas comosus*).

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo Geral

O presente trabalho objetivou a obtenção, caracterização e avaliação do uso de solventes eutéticos profundos (DESs) como agentes extratores de compostos fenólicos presentes em amostra de resíduo do abacaxi (*Ananas comosus*), seguido da determinação e quantificação dos teores presentes nos extratos obtidos.

1.1.2. Objetivo Específicos

- a) Obter sete diferentes sistemas eutéticos com diferentes graus de hidrofobicidade;
- b) Realizar a caracterização físico-química e ecotóxica dos solventes obtidos;
- c) Investigar a influência dos parâmetros mensurados no item b) quanto ao seu impacto no uso dos DESs para preparo de amostras;
- d) Desenvolver um método de preparo de amostras baseado na extração sólido-líquido de compostos fenólicos presentes no resíduo do abacaxi;
- e) Otimizar o método extrativo desenvolvido por meio de um delineamento experimental composto central (DCC).

~ **CAPÍTULO 2** ~

*Revisão da
Literatura*

Capítulo 2 - Revisão da Literatura

Este capítulo apresenta o levantamento bibliográfico realizado acerca do estado da arte quanto aos solventes eutéticos profundos, seu surgimento na literatura e inserção na química analítica. Parte da revisão aqui reportada foi publicada na forma de capítulo, intitulado “*Use of Deep Eutectic Solvent in Sample Preparation*”, no livro “*Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications and Toxicity*” da editora *Nova Science Publishers* (2022).

Palavras-chave: Preparo de Amostras; Procedimentos de Extração; Solventes Eutéticos Profundos e Química Analítica.

2. Solventes eutéticos profundos: uma breve introdução

2.1. Histórico, fundamentos e características dos solventes eutéticos profundos

Os solventes eutéticos profundos, do inglês *deep eutectic solvents* – DESs, surgiram na literatura em 2004 como resultado da busca por alternativas mais viáveis aos já consagrados líquidos iônicos (LIs), uma vez que estes são hoje tidos como uma classe de solventes pouco vantajosos do ponto de vista ambiental e dos custos de obtenção [9].

Os primeiros a reportarem a obtenção dessa nova classe de solventes foram Abbot et al. (2004) [8]. Em seu trabalho vanguardista, os autores relataram a obtenção de DESs formados a partir de cloreto de colina e alguns ácidos carboxílicos. Segundo os autores, a formação dos solventes se deu principalmente devido ao estabelecimento de ligações de hidrogênio entre a espécie aceptora da ligação (do inglês *hydrogen bond acceptor* – HBA), cloreto de colina, e as espécies doadoras da ligação (do inglês *hydrogen bond donor* – HBD).

A **Figura 2** apresenta a estrutura química de algumas das espécies químicas utilizadas no referido estudo.

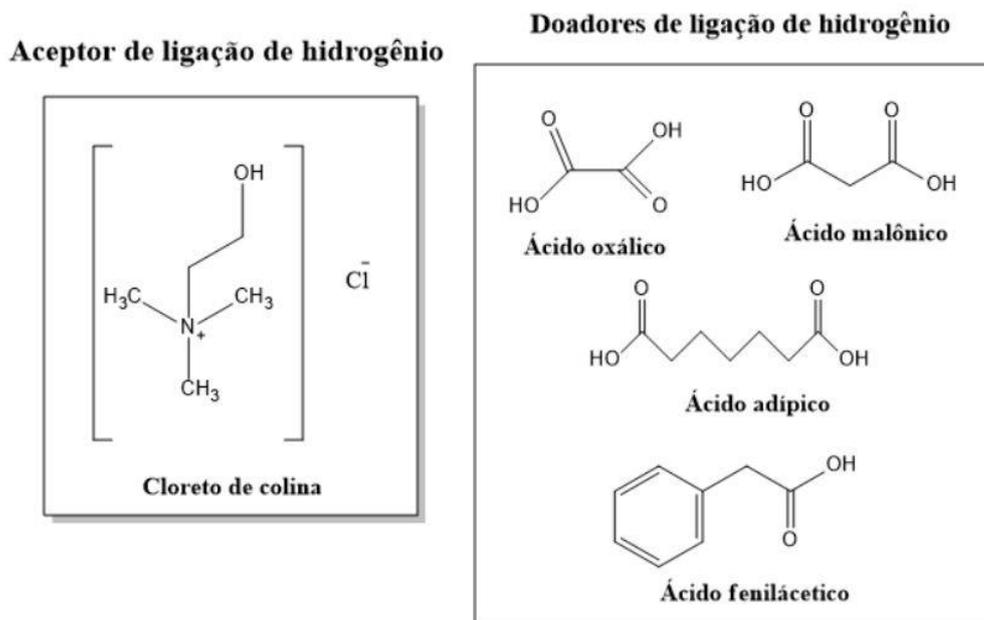


Figura 2 - Estrutura molecular de algumas espécies químicas utilizadas no trabalho de Abbott et al. (2004). **Fonte:** Autor.

Como sugerido pela própria nomenclatura desta nova classe de solventes, estes são obtidos via formação de um sistema eutético, binário ou ternário, onde o ponto de fusão (Pf) resultante apresenta-se a uma temperatura inferior às de seus precursores isolados (**Figura 3**).

Do ponto de vista químico, as espécies empregadas como HBDs e HBAs são, em geral, ácidos e bases de Bronsted-Lowry ou de Lewis, capazes de estabelecer diferentes interações intermoleculares entre si, o que leva à formação dos sistemas eutéticos [34,35].

Semelhante aos LIs, os DESs apresentam como principais características físico-químicas uma baixa pressão de vapor, uma ampla faixa de temperatura na qual se apresentam no estado líquido, sua não inflamabilidade, boa estabilidade térmica e considerável, porém regulável, viscosidade [10–12].

Embora a alta viscosidade seja um resultado atrelado ao estabelecimento das já mencionadas, e intensas, interações intermoleculares tal percalço tem sido contornado através de estudos que mostram que a adição de água, ou outros solventes polares, leva a uma mitigação das suas interações molécula-molécula, o que diminui o estado de agregação do sistema [36,37].

Embora a estratégia acima descrita proporcione maiores taxas de transferência de massa em extrações, bem como uma melhor adequação ao requisitado por equipamentos analíticos, esta deve ser realizada mediante estudos prévios para que não haja uma desestabilização de todo sistema, o que levaria à conseqüente formação de uma solução dos seus precursores em meio aquoso.

Ainda em comparação aos LIs, estes novos líquidos prótico-iônicos apresentam-se mais adequados do ponto de vista ambiental por serem considerados de baixa toxicidade [12,15].

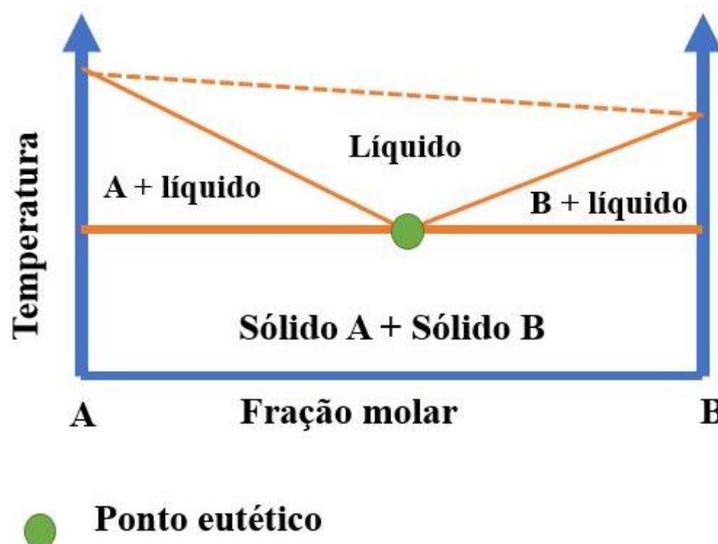


Figura 3 - Gráfico característico para formação de um sistema eutético binário. **Fonte:** Autor.

Neste contexto, e segundo Radosevic et al. (2018) [38], a relativamente baixa toxicidade apresentada pelos DESs se deve a sua própria composição pois, em geral, sua obtenção envolve a simples mistura de dois ou mais constituintes de origem natural, os quais estão presentes no próprio metabolismo de células animais e vegetais, como álcoois, ácidos carboxílicos, aminoácidos, carboidratos e alguns lipídeos.

Como forma de destacar a perspectiva acima abordada, tem sido comum encontrar na literatura a nomenclatura de “solventes eutéticos profundos naturais” (do inglês *Natural Deep Eutectic Solvents* – NADESs) quando estes são formados a partir das já referidas classes de metabólicos [14].

Desde seu surgimento na literatura, vêm sendo reportados diversos trabalhos acerca do uso dos NADES em várias pesquisas, sobretudo nas áreas de síntese orgânica e (bio)catálise, métodos eletroquímicos, obtenção de materiais nanométricos e

poliméricos, além dos vastos exemplos de uso em processos de separação [15,16]. A

Tabela 1 apresenta a composição de alguns NADES já reportado na literatura.

Tabela 1 - Composição de solventes eutéticos profundos naturais (NADES) já reportados na literatura. **Fonte:** Radosevic et al. (2018) (ADAPTADO).

NADES	Abreviação	Razão molar dos constituintes
Cloreto de colina:ácido oxálico	ChOx	1:1
Cloreto de colina:ureia	ChU	1:2
Cloreto de colina:xilitol	ChXylol	5:2
Cloreto de colina:sorbitol	ChSol	2:3
Betaína:glicose	BGlc	5:2
Betaína:ácido málico:prolina	BamPro	1:1:1
Betaína:ácido málico:glicose	BamGlc	1:1:1
Ácido cítrico:prolina	AcPro	1:1
Ácido cítrico:glicose:glicerol	AcGlcGly	1:1:1

Com o objetivo de ampliar a aplicabilidades dos já diversificados DESs, a literatura vem destacando nos últimos anos o surgimento de uma nova subclasse, a qual compreende os solventes eutéticos profundos hidrofóbicos (do inglês *hydrophobic deep eutectic solvents* (HDESs), os quais surgiram com o intuito de possibilitar a interação com matrizes e meios polares.

Ainda não há um pleno consenso acerca do quem venha de fato a ser um HDESs, pois estes não apresentam a principal característica de um sistema eutético, a profunda diminuição na temperatura de fusão em relação a precursores. Neste sentido, Florindo et al. (2019) [39] explicam que este comportamento é esperado e justificado pelo fato de a formação dos HDESs não envolver unicamente a formação de fortes interações intermoleculares (ligações de hidrogênio), mas sim a compatibilidade química entre as espécies capazes de serem misturadas entre si, o que inclui outros tipos de interações molécula-molécula.

Mesmo tendo em vista a controvérsia acima levantada, essa nova classe de DESs tem recebido bastante atenção na literatura, principalmente em procedimentos que envolvem extrações do tipo líquido-líquido onde analitos de interesse encontram-se presentes em matrizes aquosas [40,41].

De porte do que foi discutido até o momento, fica então notório que o conceito mais atual acerca dos DESs, suas classes e subclasses, está melhor compreendido como sendo a de um conjunto de líquidos prótico-iônicos obtidos a partir do estabelecimento

de diferentes formas de interações moleculares entre espécies que guardem consigo diferentes graus de afinidade química [37,42,43].

O fato supracitado faz com que a nomenclatura de “eutéticos” perca um pouco do seu sentido literal e então assuma uma conotação mais generalista. O que confere aos DESs a capacidade de serem solventes “projetáveis” conforme o uso almejado.

A **Figura 4** apresenta algumas moléculas empregadas na obtenção de HDESs já estabelecidos na literatura, na qual se destaca a possibilidade de alguns grupos de moléculas, como os ácidos carboxílicos de cadeia longa, atuarem tanto como HBD ou HBA. Mediante tanta versatilidade, fica fácil de compreender o crescente número de publicações nas quais DESs foram empregados como agentes protagonistas de alguma etapa do processo.

As publicações sobre o uso de DESs, assim como NADES iniciaram ano de 2006, ganhando maior destaque após 2014. Já o uso de HDESs despontou em 2015 e desde então segue crescendo, o que revela seu potencial de uso em novos trabalhos de pesquisa onde sua aplicação ainda não tenha sido explorada [40]. A **Figura 5** traz um demonstrativo do progresso dos trabalhos dentro deste escopo.

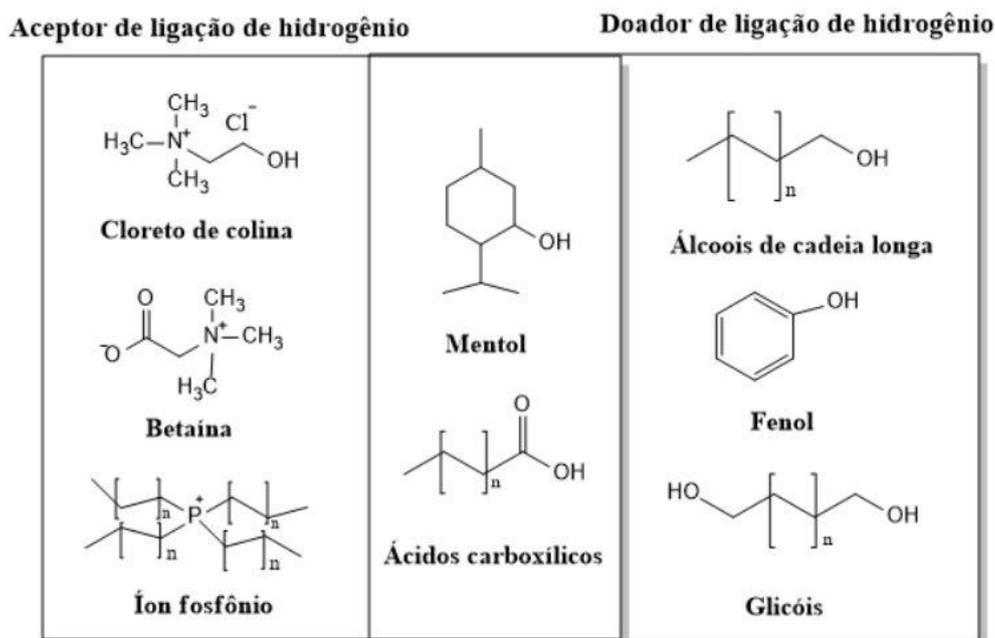


Figura 4 - Estrutura química de algumas moléculas tipicamente utilizadas na obtenção de solventes eutéticos profundos hidrofóbicos (HDES). **Fonte:** Makos, Slupek e Gebicki (2020) (ADAPTADO).

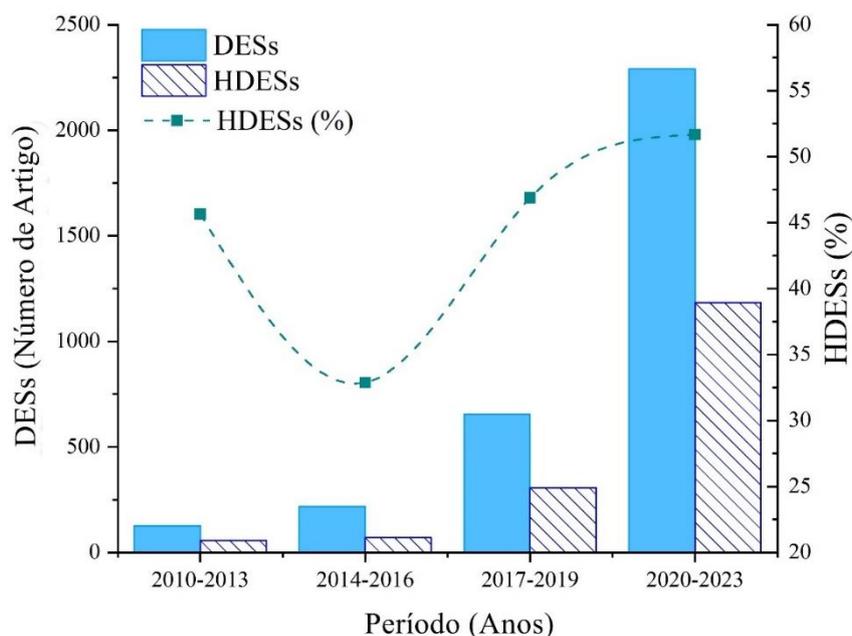


Figura 5 - Número de publicações sobre o uso de DES e HDES entre 2010 e 2023. **Fonte:** Banco de Buscas *Web of Science*.

2.2. Solventes eutéticos profundos e seu comportamento ecotóxico

Embora o emprego de DESs em processos e métodos químicos tenha sido considerado seguro e ambientalmente amigável por anos, estudos mais atuais vêm revelando que o rótulo de “verdes” dado a estes não é adequado uma vez que certos efeitos adversos já terem sido relatados. É importante destacar que, muito desse conceito generalista decorre do fato de a composição destes sistemas incluírem basicamente espécies químicas inofensivas quando isoladamente presentes no meio ambiente, o que já foi inclusive reportado na seção 1.1.

Ao serem inadequadamente descartados na natureza, solventes em geral tendem a ter como destino os meios aquáticos. Muito embora seja conhecido que a água leve à instabilidade do sistema eutético, seja este polar ou apolar, pelo estabelecimento de ligações de hidrogênio com seus constituintes [36,37,44], a sua presença em certas concentrações mínimas pode levar ao surgimento de um pronunciado efeito ecotóxico.

O aspecto acima reportado pode ser confirmado pelos resultados reportados por Macário et al. (2018) [45], os quais, e por meio da aplicação da teoria da toxicidade das misturas, concluíram que diferentes os DESs avaliados apresentaram um efeito citotóxico sobre células de *Aliivibrio sischeri*, uma espécie de bactéria marinha.

De forma semelhante, outro estudo conduzido por Radosevic et al. (2015) [13], constatou a correlação da elevação da toxicidade de alguns DESs com sua concentração em meio aquoso. Por meio da simulação de um efluente contendo diferentes concentrações de tais sistemas eutéticos, os autores observaram que concentrações acima de 5000 mg L⁻¹ pode levar a uma redução de 50% na germinação de sementes de *T. aestivum*.

O efeito acima reportado foi mais ainda mais pronunciado quando os referidos DESs foram obtidos utilizando-se um ácido orgânico como HBD o que, segundo os pesquisadores, faz com que as moléculas de ácido, quando desfeito o sistema eutético, liberem prótons (H⁺) em solução, o que gera um ambiente capaz de levar à oxidação das células vegetais usadas como biomodelo.

Nos resultados reportados no trabalho de Costa et al. (2020) [46] foi demonstrado que um extrato rico em bioativos obtidos a partir de células de *Rhodotorula mucilaginosa* CCT3892, utilizando um DESs formado por cloreto de colina e glicerol (ChGy), foi capaz de inibir 50% do crescimento de células embrionárias de ratos, Fibroblasto 3T3. Este efeito foi atribuído à interação do próprio solvente com os constituintes da parede celular das células em estudo.

Ampliando o quantitativo de estudos neste campo, Radosevic et al. (2018) [38] confirma o que está sendo aqui levantado ao verificarem também que DESs formados a partir de cloreto de colina e diferentes HBD, como ureia, xilitol e ácido oxálico, foram capazes de gerar efeitos danosos a três diferentes tipos de células humanas (HeLa, MCF-7 e HEK-293T), principalmente quando tais solventes foram obtidos utilizando-se compostos de maior caráter ácido.

Ainda sobre o efeito citotóxico sobre células humanas, Ahmadi et al. (2018) [47] mostraram, através de estudos citoquímicos, que há uma considerável relação entre sistemas de diferentes DESs com a inibição de células humanas embrionárias, HEK-293T, a qual pode ser explicada com base na livre rotação das ligações das moléculas envolvidas bem como seus tamanhos.

Segundo reportado por Lapenã et al. (2021) [48], a citotoxicidade dos DESs está além de sua inerente composição e pode ser afetada pela concentração de água no meio uma vez que esta possibilita a geração de vários, e diferentes, níveis de interação entre os constituintes do sistema e os da própria composição bioquímica das células. Os autores reforçam esta afirmação com base no efeito citotóxico apresentados por DESs,

formados entre cloreto de colina e três diferentes HBD (glicerol, urea e etilenoglicol), sobre células de microalgas (*S. capricornutum*) e bactérias (*A. fischer*).

Com relação à biodegradabilidade, em um estudo precursor na área, Wen et al. (2015) [49] mostram que nem todos os tipos de DESs podem ser considerados biodegradáveis uma vez que, por meio de um teste aeróbico de avaliação, estes concluíram que dentre oito solventes avaliados, apenas dois apresentaram rápida biodegradação, sendo estes à base de cloreto de colina e ureia (ChCl/U) e acetamida (ChCl/A). Os autores ainda destacam que os outros seis sistemas eutéticos avaliados, apresentaram baixa biodegradação semelhante à de um LI convencional.

Ainda nesta temática, ao avaliarem a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) necessária para degradar diferentes DESs, Lapeña et al. (2021) [48] concluíram que a presença de água pode afetar drasticamente a capacidade de biodegradação destes solventes uma vez que diferentes níveis de consumo do oxigênio foram requeridos para solventes diferentes em várias concentrações. Segundo os autores, diferentes métodos de avaliação deste parâmetro ambiental podem levar a diversas considerações acerca da biodegradabilidade destes sistemas uma vez que este necessita de uma concisa explicação em relação às diferentes etapas do ciclo de decomposição natural.

A compreensão de que os DESs não são isentos de danos e riscos ambientais mostra que seu uso no pleno estabelecimento de metodologias analíticas precisa ser feito tendo em vista os princípios da química analítica verde, um desafio que os químicos analíticos têm encarado atualmente com o objetivo de não só melhorar as condições do mundo contemporâneo, mas também garantir que os processos convencionais sejam otimizados e aperfeiçoados.

Ainda há uma carência significativa de trabalhos que aporem, e correlacionem, os diferentes tipos de sistemas eutéticos utilizados como solventes e seus desdobramentos ambientais. No tocante à química analítica, tal lacuna se estende inclusive à compreensão de como tais parâmetros podem assegurar que de fato uma metodologia menos danosa ao ambiente esteja sendo desenvolvida, o que pode servir de base para o desenvolvimento de novos estudos mais elucidativos.

2.3. Uso de solventes eutéticos profundo no preparo de amostras

A análise química de uma amostra quase sempre requer um procedimento de preparo que atenda aos requisitos da instrumentação analítica e/ou de separação da espécie química de interesse (analito) dos demais constituintes da matriz amostral.

Embora seja sempre preferível a análise direta das amostras, em geral, verifica-se que o preparo de amostras é quase que inevitável em um vasto número de casos associados às diferentes análises realizadas com a instrumentação disponível atualmente. A **Figura 6** mostra as etapas seguidas em uma metodologia analítica convencional, na qual verifica-se que o processamento da amostra se subdivide em pré-processamento (secagem, moagem, peneiramento, separação magnética etc.) e o preparo propriamente dito (solubilização, separação, digestão, derivatização e afins).

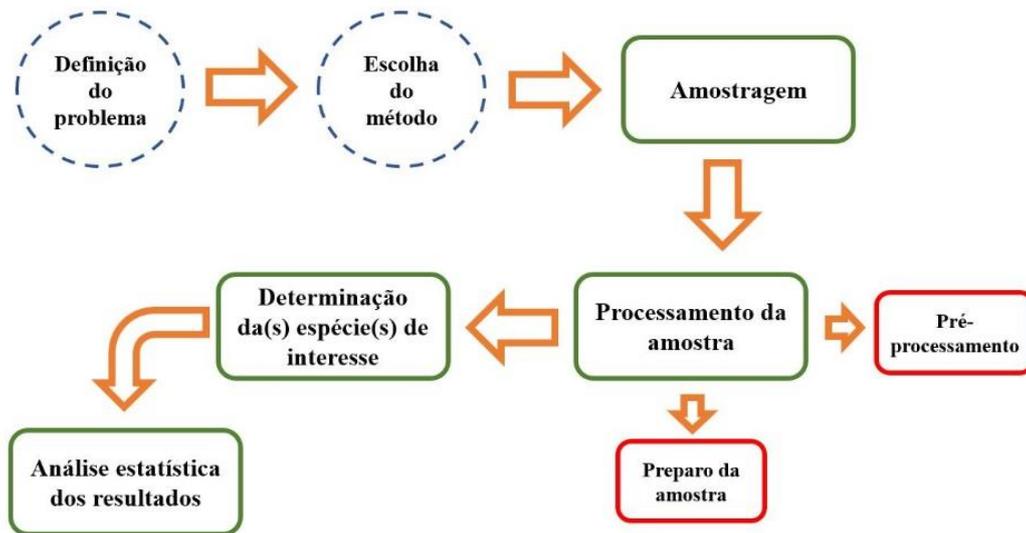


Figura 6 - Etapas inerentes a qualquer procedimento de análise química. **Fonte:** Autor.

Uma das principais operações empregadas no preparo de amostras é a extração líquido-líquido (ELL) (**Figura 7**). Isso se deve basicamente ao vasto número de amostras cujos analitos encontram-se dispersos ou dissolvidos em matrizes líquidas [50]. Além disso, até aquelas de origem sólidas podem ser dissolvidas em um meio aquoso, por exemplo, durante a etapa de pré-processamento (**Figura 6**), o que viabiliza seu manejo em bancada laboratorial.

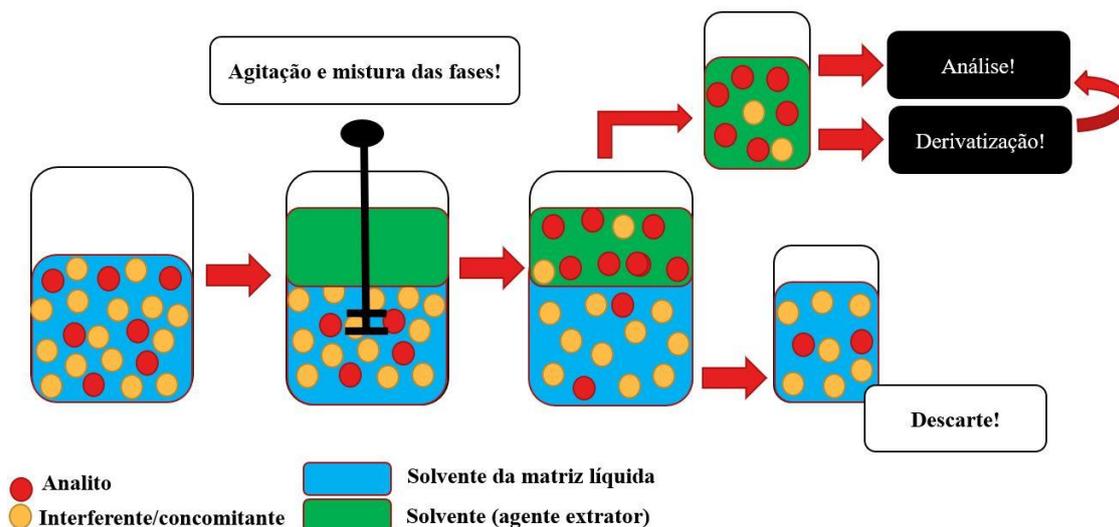


Figura 7 - Esquema sequencial de um processo de preparação de amostras por extração líquido-líquido (ELL). **Fonte:** Autor.

Quando a matriz amostral se encontra no estado sólido, o processo é então denominado de extração sólido-líquido (ESL) e, de forma bastante generalista, obedece basicamente aos mesmos fundamentos elementares da ELL, ressalvadas certamente as particularidades inerentes às interações em cada estado de agregação da matéria [50]. A

Figura 08 traz um esquema de um processo de ESL.

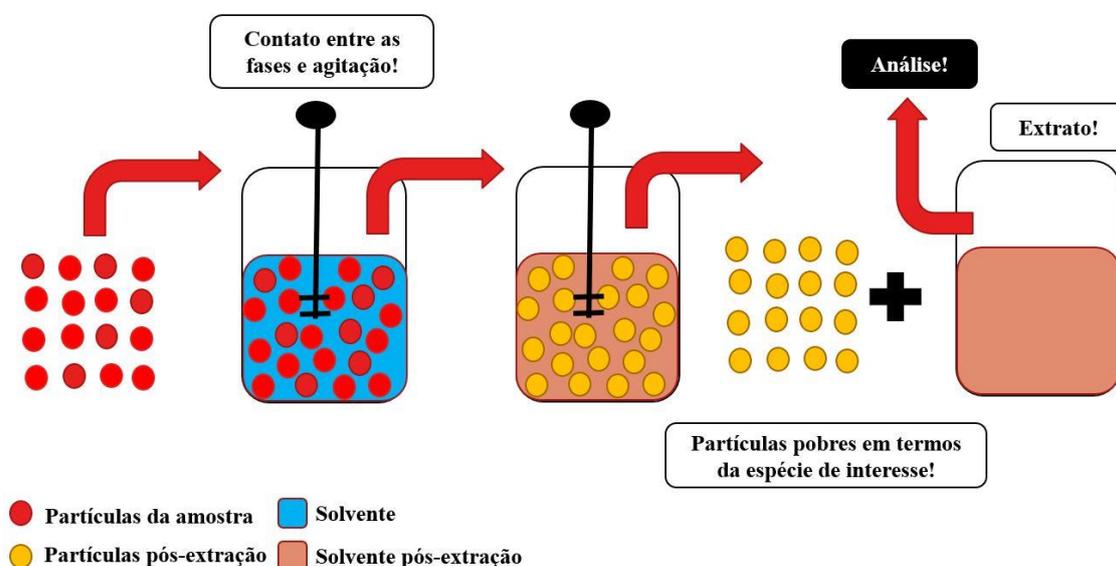


Figura 8 - Esquema sequencial de um processo de preparação de amostras por extração sólido-líquido (ESL). **Fonte:** Autor.

O princípio por trás das operações de ELL e ESL está basicamente na distribuição das moléculas do(s) analito(s) entre duas fases que apresentem baixa, ou inexistente, afinidade química entre si. O coeficiente de partição, dado pela razão entre a quantidade de analito no extrato pela quantidade na fase amostral, pode ser melhorado ao utilizar-se um solvente com maior seletividade.

A literatura tem reportado que HDEs, por exemplo, têm se mostrado como uma categoria de potenciais agentes extratores para uma série analitos, dentre os quais pode-se destacar alguns compostos como pesticidas, álcoois e flavoneídeos presentes em amostras aquosas [40].

Outro interessante demonstrativo de aplicabilidade para HDEs em processos extrativos analíticos pode ser ilustrado pelos resultados apresentados por Ruggeri et al. (2019) [51] os quais realizaram a extração de cromo (Cr (IV)) presente em amostras aquosas. Já Schaffer et al. (2018) [52] reportaram a separação de cobre (Cu (II)) e outros metais de transição presentes em matrizes análogas à anteriormente mencionada através do uso de DES como agente extrator, fazendo-se aqui um destaque ao fato dos autores também terem avaliado a possibilidade de reuso do solvente em questão, o que potencializa o caráter ambiental da metodologia proposta.

Outro trabalho voltado à determinação de elementos inorgânicos em amostras biológicas foi conduzido por Habibi et al. (2013) [53] onde fora realizado o desenvolvimento de um método analítico visando à determinação de ferro (Fe), cobre (Cu) e Zinco (Zn) em amostras de peixe marinho. A abordagem principal consistia na dissolução de 100 mg das amostras em meio contendo DES à base de cloreto de colina e ácido oxálico. Em sua melhor condição, o método foi conduzido a 100 °C por 45 min como etapa anterior à análise dos constituintes inorgânicos por espectrometria de emissão atômica de chama.

O uso de DESs no desenvolvimento de metodologias voltadas à análise elementar e à especiação de constituintes inorgânicos ainda é bem restrito haja vista a carência de mais trabalhos nesta área, o que já não pode ser dito com relação à extração e determinação de constituintes orgânicos, sendo essa a aplicação mais amplamente encontrada em trabalhos dentro desta temática.

Um exemplo bastante pertinente que ilustra tal abordagem é o do trabalho realizado por Dogan, Elik e Altunay (2020) [54] no qual foi feita a determinação de paracetamol,

um composto orgânico com atividade antipirética e analgésica, em amostras de urina sintética. Nesta pesquisa em questão, os autores sintetizaram alguns NADESs utilizando dois diferentes HBAs (cloreto de colina e betaína) e três HBDs (ácido málico, glicose e ácido oxálico), tendo como melhor resultado o uso do solvente à base de betaína e ácido oxálico, o que possibilitou a obtenção de uma metodologia assistida por agitação em mesa orbital seguida da análise por espectrometria UV-Vis para determinação da molécula alvo da análise.

A metodologia acima mencionada, por sua vez, apresentou uma boa linearidade ($50\text{-}800\ \mu\text{g L}^{-1}$) bem como excelentes percentuais de recuperação (94,2-107,1%) e baixo limite de detecção (LOD) ($14,9\ \mu\text{g L}^{-1}$). O método também foi aplicado à determinação do fármaco alvo presente em comprimidos vendidos comercialmente em farmácia. Embora o trabalho tenha tido bastante êxito em seu desenvolvimento, o mesmo realizou uma otimização dos parâmetros por meio de uma abordagem univariada, o que inviabiliza a compreensão dos efeitos combinados das variáveis estudadas. Além disso, o número de experimentos realizados leva a uma quantidade considerável de experimentos quando comparado com o uso de técnicas multivariadas, sendo então insatisfatória no quesito de agregação de um caráter ecológico não só à metodologia final, mas também ao seu desenvolvimento, devido ao montante de resíduo analítico gerado.

Outro ponto interessante é que Dogan et al. (2020) [54] atribuem uma diminuição no sinal analítico ao aumento do volume de DES utilizado no procedimento de extração não só pelo efeito de diluição causado, mas porque após a extração, diluições da fase orgânica foram realizadas para que sua viscosidade diminuísse e assim possibilitasse sua melhor adequação à instrumentação empregada (espectrofotômetro UV-Vis). De fato, a maior agregação causada pelo aumento das interações entre as próprias moléculas do solvente e destas para com o analito fazem com que tal parâmetro se intensifique. Todavia, a solução mais adequada seria um estudo sobre a fluidodinâmica dos DESs para determinar qual adição prévia de água seria capaz de ajustar este parâmetro reológico sem comprometer a capacidade de extração, e não proceder à adição pós-operação, o que pode comprometer o sinal analítico.

Estudos com base na reologia dos DESs, e seus derivados, já existem mesmo que em pequeno volume. Entretanto, um olhar voltado para a química analítica ainda precisa ser dado e pode vir a ser alvo de futuros estudos uma vez que o ajuste da viscosidade

não só melhora a capacidade de extração mediante intensificação da difusão do analito por entre as fases como também adequa o extrato obtido aos requisitos das próprias instrumentações de análise.

Ainda falando sobre metodologias voltadas à análise e quantificação de fármacos, outro trabalho consideravelmente relevante foi realizado por Faraz et al. (2021) [55] e teve como foco a obtenção de um método para determinação e quantificação de niclosamida, um bactericida utilizado no tratamento de cólicas e diarreia, em amostras farmacêuticas e de efluentes por espectroscopia UV-Vis. Como melhor solvente extrator, o trabalho destaca o DES obtido a partir de cloreto de colina e fenol, o que possibilitou o estabelecimento de um protocolo analítico com uma boa faixa de linearidade (4,8 a 48 $\mu\text{g L}^{-1}$), baixos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) (0,112 e 0,374 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente) além de uma recuperação de 99,26%.

Embora sejam proeminentes os resultados acima descritos, algumas ressalvas precisam ser feitas, pois como o objetivo do uso de sistemas eutéticos como solventes extratores é o de obter metodologias o mais adequado possível às várias demandas associadas à sustentabilidade ambiental. O uso de fenol como um dos agentes formadores do DES compromete totalmente tal perspectiva, pois como é de conhecimento comum, este reagente possui elevada toxicidade. Uma solução possível seria o uso de outros sistemas, inclusive testados no artigo, onde o HBD apresentava-se na forma de uma espécie mais biocompatível, como glicerol e etilenoglicol, seguida da otimização multivariada de seu uso, o que provavelmente melhoraria os já significativos resultados obtidos.

Partindo então para o escopo da separação e quantificação de compostos orgânicos em diferentes matrizes, pode-se citar o trabalho realizado por Dai et al. (2014) [56], no qual foi feita a recuperação, via extração ESL, da fração de constituintes fenólicos presentes em amostras de açafraão (*Carthamus tinctorius L.*) utilizando NADES como agentes extratores, os quais relatam rendimentos variando numa faixa entre 75 e 95%. Um resultado bastante relevante reportado neste trabalho destaca que a adição de água ao solvente eutético natural empregado leva a maiores percentuais de rendimento da extração do que quando este fora utilizado na forma livre da presença de H_2O .

A constatação acima reportada pode ser atribuída há dois fatores fundamentais, sendo um a mitigação da viscosidade devido ao enfraquecimento da rede criada pelas

fortes interações intermoleculares e a consequente elevação da hidrofiliçidade do solvente, o que o torna mais específico à recuperaçãõ de constituintes desta natureza.

Estudos realizador por Zeng et al. (2014) [57], por meio de uma abordagem quimiometrica multivariada, avaliaram a influênciã de algumas variáveis sobre a recuperaçãõ de albumina presente em amostras de soro bovino. No trabalho dos autores, quatro NADESs foram sintetizados e quatro fatores foram selecionados como cruciais para a otimizaçãõ do processo, sendo eles: massa de solvente utilizada, concentraçãõ do reagente promotor do efeito *salting out*, o tempo de processo e a temperatura de extraçãõ. Os percentuais de recuperaçãõ obtidos foram bastante satisfatõrios, variando de 99,7% a 100,5%.

Em alguns outros casos específicos, o uso de DESs pode nãõ eliminar a total dependênciã do processo pelo uso de solventes orgânicos, todavia pode prontamente promover uma mitigaçãõ nos volumes utilizados, como foi o caso do trabalho desenvolvido por Halalat-Nezhad et al. (2015) [58] onde estes reduziram o uso de cicloexano empregado na extraçãõ e quantificaçãõ de alguns hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes em amostras de peixes marinhos utilizando, em sua prévia digestãõ, um sistema binário obtido a partir da reaçãõ entre cloreto de colina e ácido oxálico. Todo o processo foi conduzido a 55 °C por 30 minutos, o que pode ser considerada uma condiçãõ muito branda do ponto de vista da demanda energétiã requerida. A metodologia em questãõ ainda atingiu baixos limites de detecçãõ e quantificaçãõ utilizando como técnica analítica a cromatografia líquida de alta eficiênciã (CLAE) acoplada a um detector de fluorescênciã.

Objetivando contribuir com a elaboraçãõ de um método que atenda a notória demanda por análise de água visando à determinaçãõ de parâmetros que norteiem acerca de sua qualidade, Wang et al. (2021) [59] desenvolveram uma metodologia, dentro dos ditames da miniaturizaçãõ dos procedimentos analíticos, onde a determinaçãõ e quantificaçãõ de teores de filtro de proteçãõ ultravioleta em níveis traços foi possível devido a um preparo das amostras, água de rios e piscina, por meio do uso de DESs em um processo de microextraçãõ líquido-líquido (MELL) anteriormente à análise por cromatografia líquida de alta eficiênciã acoplada a um detector UV-Vis. Estes autores ainda relatam o alcance de excelentes percentuais de recuperaçãõ (90,2 – 103,5%) e baixos limites de detecçãõ (0,15 – 0,30 ng mL⁻¹) para todos os filtros investigados.

É importante destacar que o uso de procedimentos de extração miniaturizados não só configura um avanço do ponto de vista da química analítica verde devido à menor geração de resíduos pós-análise, como também favorecem a obtenção de maiores fatores de pré-concentração do(s) analito(s) alvo(s). Em consequência disso, há uma melhora no sinal analítico, sendo este proporcional à concentração da(s) espécie(s) química(s), o que leva a menores limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ). O uso de solventes “projetáveis” como os DESs faz com que características específicas sejam introduzidas no solvente a ser desenvolvido e conseqüentemente amplie sua afinidade e especificidade pela(s) molécula(s) ou demais espécies em análise.

Outro exemplo dentro das possibilidades cabíveis à miniaturização dos processos de preparo de amostras está bem ilustrado no trabalho conduzido por Moghadam, Rajabi e Asghari (2018) [60] no qual um método eficiente e relativamente seguro foi desenvolvido visando à determinação de antidepressivos presentes em amostras biológicas complexas. Como abordagem operacional, os autores desenvolveram um processo de emulsificação assistida por agitação aerada utilizando como agente extrator um DESs formado a partir de cloreto de colina e fenol. Segundo os autores, a formação de interações do tipo π - π justificam a melhor ação extratora do solvente escolhido frente aos demais testados. As principais variáveis independentes do processo foram otimizadas por meio de um planejamento experimental composto central, que permite não só avaliar a influência das variáveis capacidade de extração do solvente, como também maximizar o processo estudado.

Ainda dentro da temática aqui abordada, vale destacar que um aspecto bastante relevante sobre a atual sociedade é o de que esta está cada vez mais crítica e preocupada com o que ingere durante a realização de refeições ou consumo de medicamentos. Sendo assim, muitas pesquisas estão sendo conduzidas com o objetivo de verificar a presença e a quantidade de pesticidas em alimentos. Neste sentido, um trabalho bastante interessante foi realizado por Sereshti et al. (2021) [61], no qual foi desenvolvido um processo de extração sólido-líquido através do uso de novos adsorventes funcionalizados seguidos da recuperação dos analitos por um processo de dessorção destes utilizando como solventes um HDES formado por cloreto de colina e clorofenol, seguido da análise por cromatografia gasosa a um detector por captura de elétrons.

No campo da química (bio)analítica, há uma vasta gama de exemplos possíveis de serem citados onde DESs foram aplicados como agentes ativos da etapa de preparo das

amostras. Um exemplo específico está contido no trabalho conduzido por Jeong et al. (2018) [62] onde foi avaliado o uso de DESs na etapa de extração de monoterpenos e compostos voláteis presentes em folhas de menta (*Mentha piperita L.*) seguido pela análise das referidas espécies bioquímicas por cromatografia gasosa acoplada a um detector de massas. Como solvente extrator, os autores utilizaram um sistema eutético formado a partir do cloreto de colina e glicose, o que confere uma perspectiva sustentável e viável à metodologia obtida.

A análise de constituintes bioquímicos presentes em tecidos vegetais também norteou o escopo do trabalho de pesquisa realizado por Wang et al. (2018) [63] tendo os autores avaliado a capacidade extratora de um NADES. Desse modo, os autores relatam terem sido capazes de obter um protocolo analítico seguro e eficaz capaz de possibilitar a determinação e a quantificação de três compostos artemisínicos, presentes em folhas de *Artemisia annua*, por análise direta utilizando espectrometria de massas em tempo real.

2.4. Compostos Fenólicos: uso de solventes eutéticos profundos em sua extração e quantificação

De um modo geral, a classe dos compostos fenólicos, ou dos polifenóis, pode ser definida como aquela que compreende espécies químicas que, em sua estrutura básica, apresentam um, ou mais, anéis aromáticos com ao menos um, ou mais, grupos hidroxilas (-OH) a estes diretamente ligados. Na natureza, destaca-se que há a ocorrência de cerca de 10000 exemplares de estruturas correspondentes a esta descrição. É importante também salientar que, devido à presença de agrupamentos polares em suas estruturas, a maioria dos compostos fenólicos são solúveis em água, estando geralmente disponíveis na forma de dímeros ou polímeros onde suas unidades encontram-se unidas por ligações de natureza covalente, as chamadas ligações glicosídicas [20,28,32,64–66].

A **Figura 9** apresenta a estrutura dos principais grupos de compostos fenólicos, dos ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos (a) e ácidos hidroxicinâmicos (b)) e o dos flavonoides (c).

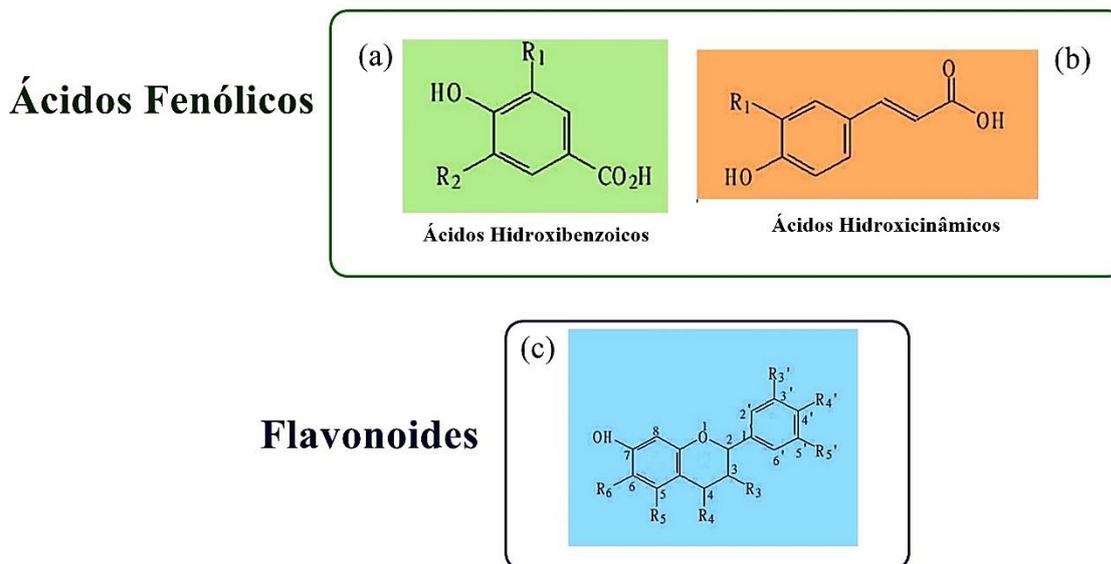


Figura 9 - Estrutura básica dos principais grupos de compostos fenólicos. **Fonte:** Sousa et al. (2020) (ADAPTADO). **Nota:** Os agrupamentos “R’s”, nas estruturas, denotam diferentes grupos substituintes que configuram cada composto fenólico em específico.

O crescente interesse científico sobre os compostos fenólicos se deve particularmente ao fato da facilidade de encontrá-los em tecidos naturais, tais como as cascas de frutas, hortaliças, e flores, bem como nos benefícios que estes promovem à saúde dos seres humanos, sobretudo devido as suas fortes atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e antibactericida [21,25,65,67,68].

Do ponto de vista farmacológico e nutricional, essa classe de biomoléculas apresenta propriedades ainda mais interessantes, tais como as de inibição da oxidação lipídica e da proliferação de fungos patogênicos [69–73], podendo então serem empregados como conservantes naturais, em substituição aos sintéticos, os quais são tóxicos e pouco ambientalmente amigáveis.

Ainda sobre suas propriedades bioquímicas, pesquisas atuais vêm reportando que a ingestão de compostos fenólicos, por meio da alimentação ou da administração de suas formas isoladas, pode levar à melhora de quadros de doenças endêmicas e severas, tais como dengue, malária, COVID-19 etc.

Com relação à última doença endêmica acima citada, Khalil e Tazeddinova (2020) [32] destacam em seu trabalho de revisão que a potencial atividade antiviral dos compostos fenólicos faz com que estes aumentem a imunidade, e consequente resistência, do corpo humano contra a infecção do agente causador da COVID-19

(SARs-CoV-2) e outras infecções virais que atendam aos mesmos mecanismos de instauração e proliferação.

De acordo com Gligorijevic et al. (2021) [31] o efeito antiviral dos polifenóis pode ser atribuído à diversos fatores, que vão além do fato de aumentarem a resposta imunológica dos indivíduos acometidos pela infecção viral. Os autores destacam ainda que sua atividade de combate ao estresse oxidativo, potencializado durante quadro clínico severo, bem como sua habilidade de modulação da sinalização celular, podem ser apontadas como razões para seus efeitos benéficos dentro deste contexto.

No trabalho conduzido por Davella, Gurrupu e Mamidala (2022) [33], foi explorado o potencial antiviral *in-silico* de compostos fenólicos, extraídos da pimenta negra (*Piper nigrum*), por meio das técnicas de docking molecular e modelagem dinâmica, o que constatou que algumas das moléculas investigadas se mostraram como fortes candidatas a serem empregadas como ligantes ativos na inibição da principal enzima protease atrelada ao ciclo bioquímico da COVID-19.

Em termos de técnicas extrativas, que visam à sua obtenção e/ou quantificação de polifenóis, é comum encontrar na literatura o uso bem-difundido de misturas de solventes orgânicos, como etanol, metanol, acetona e acetonitrila, como agente extrator, sendo a extração do tipo sólido-líquido a mais amplamente utilizada haja vista a natureza das próprias matrizes onde estas moléculas e interesse são encontradas [64,74,75].

No estudo desenvolvido por Ezez e Tefera (2021) [76], a exemplo do que foi dito no parágrafo anterior, é possível verificar-se um estudo acerca da eficiência extrativa de alguns solventes orgânicos tradicionais (etanol, metano, acetona e etil acetato) na extração da fração polifenólica presente em amostras de gengibre (*Zingiber officinale*), tendo o metanol apresentado a melhor capacidade extratora, tomando como referência a concentração de fenólicos totais presentes na fração fluida após o processo de extração sólido-líquido (1183,813 mgEAG 100 g⁻¹).

No entanto, ao estudar a extração de compostos fenólicos em amostras de frutos de pêssego (*Prunus persica L.*), Mokrani e Madani (2016) [77] constataram que o melhor agente extrator, frente aos investigados (etanol, metanol, acetona e água), foi a acetona, tendo o extrato, obtido na condição otimizada, apresentado uma concentração total de polifenóis equivalente a 363 mgEAG 100 g⁻¹).

Ainda neste presente contexto, Mendes et al. (2019) [78] investigaram a extração e quantificação de compostos fenólicos presentes em amostras de castanha de caju (*Anacardium occidentale L.*) por meio da aplicação de uma abordagem multivariada. Os autores destacaram que a extração conduzida por meio do uso de etanol (5,93 mgEAG g⁻¹) apresentou uma eficiência semelhante ao uso de uma mistura ternária formulada a partir de acetona, metanol e do próprio etanol (5,92 mgEAG g⁻¹). Todavia, estes também pontuam que o uso de etanol apresentou melhor seletividade aos analitos de interesse uma vez que a mistura ternária tenha induzido à extração concomitante de outros biocompostos, tais como carboidratos e ácidos graxos.

Neste contexto, é importante salientar que, embora o uso de solventes orgânicos tradicionais como agentes extratores na extração e quantificação de compostos fenólicos seja uma constatação, estudos mais atuais já demonstram a possibilidade do uso de DESs nas etapas de obtenção destes biocompostos a partir de suas matrizes naturais de origem. Neste cenário, é possível destacar o trabalho realizado por Gao et al. (2020) [66], os quais conduziram um estudo onde o emprego de NADESs, sobretudo à base de cloreto de colina e glicerol (1:2 mol mol⁻¹), apresentou uma promissora capacidade de extração quando ao mesmo foi adicionado um teor de água equivalente a 20% (m m⁻¹), obtendo-se uma extração de cerca de 8352 mg g⁻¹ de fenólicos totais a partir de folhas de amora por um processo assistido por micro-ondas e conduzido a 66 °C por 18 min.

No trabalho conduzido por Espino et al. (2018) [64], ferramentas de métricas ambientalmente estabelecidas foram empregadas para mensurar o aspecto sustentável de um processo de extração, seguido da quantificação, de compostos fenólicos presentes em uma planta tradicionalmente empregada para fins medicinais na Argentina, a *Larrea cuneifolia*, tendo um NADESs à base de ácido láctico e glicose (5:1 mol mol⁻¹) demonstrado um excelente desempenho, mesmo em vista dos tradicionais solventes orgânicos também avaliados pelos autores.

Já a pesquisa conduzida por Loarce et al. (2020) [79], por sua vez, ocorreu a investigação de um método de extração de compostos fenólicos, a partir da matriz sólida dos subprodutos da vinificação, fazendo-se uso de água em condição subcrítica e solventes eutéticos profundos. Os autores ainda relataram que, embora o DES à base de cloreto de colina e ureia tenha mostrado uma boa capacidade extrativa, sua alta viscosidade teve que ser ajustada pela adição de água ao sistema (30% m m⁻¹), sendo a temperatura de 100 °C mais apropriada para condução do processo tendo em vista que

assim evita-se que os produtos sejam degradados ou que estes participem de reações Maillard.

Outro ponto que merece destaque dentro da questão aqui discutida é que, atualmente, pesquisas que objetivam o uso de resíduos alimentícios como fonte de compostos fenólicos vêm ganhando bastante notoriedade, sobretudo devido ao fato destas impulsionarem o desenvolvimento sustentável e a mitigação dos impactos gerados pelas atividades humanas [80–84].

2.5. Matrizes lignocelulósicas como fontes alternativas de compostos fenólicos

Em termos do setor industrial, a relevância dos processos extrativos que visam à extração e quantificação de compostos fenólicos em diferentes matrizes pode ser corroborada pelo fato de estes estarem presentes na formulação de diversos produtos, tais como: alimentos, fármacos, cosméticos e suplementos nutracêuticos [20,85].

No entanto, as severas críticas aos padrões de consumo da geração atual têm levado à necessidade de se repensar o setor industrial como um todo. Nesse contexto, o uso de resíduos oriundos das atividades industriais como fontes de novos produtos químicos tem sido visto como uma alternativa eficiente dentro de um contexto econômico mais ecologicamente correto e circular [81,82,84,86,87].

Silva et al. (2023) [88], por meio de dados do Departamento de Assuntos Econômicos e Sociais das Nações Unidas (*United Nations Department of Economic and Social Affairs – UNDESA*) de 2019, apontam que até 2050 a população mundial deva atingir a marca de 9,7 bilhões de indivíduos, o que aumentará a necessidade por comida. Além disso, os autores também destacam que a cadeia de produção de alimentos precisa se tornar mais sustentável pois cerca de 8% de toda toda emissão antropogênica global de gases de efeito estufa são oriundas dela, além desta ser responsável pelo consumo de cerca de 20% de toda água potável existente.

Ainda dentro da perspectiva acima discutida, de acordo com Rico et al. (2020) [84], dados da Organização das Nações Unidas para Alimentos e Agricultura (*Food and Agriculture Organization (FAO)*) apontam que cerca de 1,3 bilhões de toneladas de comida são jogadas fora tanto por consumidores quanto por produtores. Os autores ainda pontuam que, só na Europa, a geração de resíduos a partir de alimentos chega à marca de 88 milhões de toneladas, algo em torno de 173 kg por pessoa, anualmente.

Sendo assim, uma indústria adequada aos conceitos da economia circular e da sustentabilidade é aquela onde não há a existência de resíduos e/ou subprodutos, mas

sim a reinserção de coprodutos gerados ao longo da cadeia produtiva, reintegrando os resíduos ao processo, o que garante maiores índices de eficiências ambientais, sociais e de rentabilidade [81]. Neste cenário, o uso do biorrefino das biomassas lignocelulósicas vem ganhando considerável destaque nas últimas décadas [81,89–92].

As biomassas lignocelulósicas são de grande ocorrência natural e apresentam como principal composição químico-estrutural três biopolímeros fundamentais, a saber: a celulose, a hemicelulose e a lignina. Em geral, e principalmente no setor agroindustrial, estes materiais de alto potencial agregado são gerados em grandes quantidades, sendo pouco reaproveitados [86].

Neste cenário, o reuso destes biomateriais como matéria-prima pode ser útil também para a produção de biocombustíveis [89,93–98]. No entanto, estudos mais recentes vêm demonstrando a potencial aplicabilidade destes como fonte de compostos fenólicos com alta capacidade oxidante, sendo obtidos pela despolimerização da lignina, a qual é um heteropolímero amorfo composto majoritariamente por unidade de polifenóis [99–102].

Em seu trabalho de revisão, Méndez-Loranca et al. (2023) [86] destacam que em muitos resíduos agroindústrias, tais como cascas, sementes, folhas e bagaços, já foram encontrados diferentes tipos de polifenóis, tais como o ácido gálico e o ácido ferúlico. Dentre os resíduos mais amplamente estudados, os autores ainda pontuam a predominância do uso da cana-de-açúcar, palha de arroz e restos de frutas como as principais matrizes atualmente investigadas.

Dentre a vasta gama de possibilidades para tais aplicações, o resíduo do abacaxi (*Ananas comosus*) apresenta-se como uma proeminente alternativa, destacando-se que o seu processamento na agroindústria gera como principais resíduos a coroa (2,7-5,9% do material) e a casca (29-42% do material) [103].

Em termos botânicos e geográficos, o abacaxi é uma planta monocotiledônea pertencente à família Bromeliaceae, facilmente encontrada em países tropicais como Brasil, Filipinas, Indonésia e China [103]. No Brasil, especificamente, foram produzidos cerca de 1.545.036 mil frutos em todo país, sendo a maior produção concentrada nos estados do Pará (361.027 mil frutos) e Paraíba (263.370 mil frutos), segundo relatório da Embrapa 2022.

No Trabalho de Alias e Abbas (2017) [105], um novo método de extração de compostos fenólicos a partir da casca do abacaxi, assistido por micro-ondas, foi

desenvolvido, tendo sido a melhor condição extrativa alcançada a uma potência de 750 W, uma temperatura de 65 °C e utilizando-se uma mistura 50% (v v⁻¹) de etanol e água, obtendo-se um teor de 207,72 mgEAG g⁻¹. Todavia, embora os autores tenham utilizado uma matriz lignocelulósica em seu estudo, este não se fez com amostras já processadas industrialmente.

Por sua vez, Sepúlveda et al. (2018) [87] propuseram uma alternativa para a valorização do resíduo do abacaxi por meio de um processo de autohidrólise, onde apenas água é empregada como agente extrator. Por meio de um delineamento experimental Box-Behnken, os autores investigaram a influência da temperatura, da razão sólido-líquido e do tempo de reação sob a extração dos bioanalitos alvos. Em sua melhor condição (200 °C, 30 min e razão 1:10 sólido-líquido), os autores reportaram uma extração de cerca de 1,75 g L⁻¹ de polifenóis, tendo sido detectada neste montante a presença de ácido gálico, epicatequina, ácido cafeico, ácido cumárico e outros.

No tocante ao uso dos DESs para tais finalidades, é importante pontuar o trabalho realizado por Vargas-Sena, Ochoa-Martínez e Vélez-Pasos (2022) [106], o qual se propôs a desenvolver um método de extração, assistido por micro-ondas, de compostos fenólicos presentes na casca do abacaxi. Os autores destacam que a maior extração dos biocompostos alvos (7,98 mgEAG g⁻¹) se deu utilizando-se um DES à base de cloreto de colina e glicerol, sendo esta superior inclusive às extrações onde misturas aquosas de etanol e metanol, 50% (v v⁻¹), foram empregadas como agentes extratores.

Desta forma, fica notório que o campo exploratório do uso de matrizes lignocelósicas, em especial o abacaxi (*Ananas comosus*), apresenta-se como amplamente aberto para novos estudos voltados à extração e quantificação de suas frações polifenólicas, destacando-se ainda a possibilidade de estudos de novos sistemas eutéticos mais eficientes bem como a de otimizar-se estratégias mais viáveis tanto do ponto de vista operacional quanto do da sustentabilidade.

~ CAPÍTULO 3 ~

*Avaliação Físico-química e Ecotóxica de
Diferentes Solventes Eutéticos
Profundos para Aplicações em Química
Analítica Verde*

Capítulo 3 – Avaliação Físico-química e Ecotóxica de Diferentes Solventes Eutéticos Profundos para Metodologias Analíticas Verdes

Este capítulo apresenta os resultados experimentais obtidos para a síntese, caracterização e avaliação das propriedades físico-químicas e ecotóxicas de sete diferentes solventes eutéticos profundos obtidos na presente pesquisa. Uma correlação consistente acerca destas propriedades e seus desdobramentos no uso dos solventes em preparo de amostras também foi realizada de modo a contribuir para o esclarecimento de lacunas ainda existentes quanto a esta aplicação específica. Os presentes dados compõem o primeiro artigo oriundo desta tese e encontram-se publicados no periódico *“Environmental Science and Pollution Research”* (Qualis Capes (2017-2020): A2 e Fator de Impacto: 5,8) sob o seguinte título: *“Physical-Chemical and Ecotoxic Evaluation of Different Deep Eutectic Solvents for Green Analytical Applications”*.

Palavras-chaves: Propriedades Físico-químicas; Perfil Ecotóxico; Capacidade Inibitória Mínima; Comportamento Reológico; Solventes Eutéticos Profundos e Química Analítica Verde.

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes e soluções

Os principais reagentes químicos utilizados (cloreto de colina, pentanol, octanol, ácido cítrico, glicerol, ureia e ácido láctico) foram obtidos da marca Sigma Aldrich e apresentavam grau de pureza superior a 98%. Os demais reagentes, descritos nas etapas a seguir, foram obtidos em grau analítico.

3.2. Obtenção dos DESs

DESs hidrofílicos foram obtidos por meio da mistura da espécie HBA (cloreto de colina) com a (s) espécie (s) HBD. As devidas massas de ambos os constituintes foram medidas adequadamente em balança analítica (*SHIMADZU – AY220*) e transferidas para tubos cônicos de 50 mL, os quais foram rigorosamente vedados com Parafilme para evitar a adsorção de água pelas espécies higroscópicas presentes no sistema. A síntese foi conduzida a $80,0 \pm 0,1$ °C em banho térmico (*UNIQUE – USC-1800A*) e algumas agitações periódicas (a cada 10 minutos) foram realizadas manualmente em vórtex (*SCIENTIFIC INDUSTRIES – G560E*) até que fosse atingida a formação de

sistemas monofásicos de aspectos translúcidos. Os HDESs foram obtidos a $60,0 \pm 0,1$ °C, também mantido em banho térmico, através da mistura dos componentes em suas composições molares adequadas. Agitações periódicas também foram realizadas até que o sistema mudasse de um aspecto leitoso para translucido e monofásico. A **Tabela 2** apresenta os constituintes dos sistemas obtidos e suas respectivas proporções molares.

Tabela 2 - Composição química e molar dos solventes eutéticos estudados.

Aceptor da Ligação de Hidrogênio (HBA)	Doador (es) da Ligação de Hidrogênio (HBD)	Abreviação	Respectiva razão molar
Cloreto de Colina	Glicerol	ChGy	1:2
Cloreto de Colina	Ureia	ChU	1:2
Cloreto de Colina	Ácido Lático	ChLa	1:1
Cloreto de Colina	Glicose e Ácido Lático	ChGuLa	5:2:1
Cloreto de Colina	Ácido Lático e Ácido Cítrico	ChLaCa	2:2:1
Ácido Lático	Glicerol e Pentanol	PtGyLa	1:3:3
Ácido Lático	Glicerol e Octanol	OcGyLa	3:1:1

3.3. Caracterização físico-química dos DESs e HDSs obtidos

3.3.1. Caracterização das propriedades estruturais

A caracterização das interações formadas entre os precursores dos sistemas eutéticos avaliados foi realizada por meio da obtenção de espectros, usando a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR) em um equipamento *SHIMADZU* – IRPrestige21. Os espectros foram obtidos na faixa de 4000 a 600 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} e 4 varreduras.

3.3.2. Caracterização do comportamento reológico

A investigação do comportamento reológico dos sistemas aqui obtidos foi conduzida em um reômetro (*Brookfield* – LVDVIII ultra) com spindle CPE52. O equipamento foi acoplado a um sistema de controle térmico, sendo a análise processada pelo software Rheocalc 32. A análise foi conduzida a $25,0 \pm 0,1$ °C e pressão atmosférica. A partir dos dados obtidos, a viscosidade média dos fluidos também foi medida. Para os DESs à base de cloreto de colina, mais hidrofílicos, o efeito da adição de água sobre os parâmetros reológicos foi também avaliado nas proporções de 10, 20 e

30 % (g g⁻¹). Uma comparação entre as propriedades dos HDESs e dos álcoois precursores (octanol e pentanol) foi realizada para fins de compreensão da repercussão das interações estabelecidas.

3.3.3. Determinação da tensão superficial

A tensão superficial dos fluidos eutéticos foi realizada em um tensiômetro (*SensaDyne Tensiometer* – QC3000) pelo método da máxima pressão de bolha. Neste método, dois capilares com diferentes tamanhos de orifícios são diretamente imersos no fluido a ser analisado e bombeiam para o interior deste um gás inerte (nitrogênio), o que leva a produção de uma pressão diferencial, o qual é diretamente proporcional à tensão do fluido. Para os DESs à base de cloreto de colina, o efeito da adição de água sobre tal propriedade foi avaliado por meio da adição desta nas proporções de 10, 20 e 30 % (g g⁻¹). De forma semelhante a caracterização reológica, foi estabelecida uma comparação entre as propriedades dos HDESs e dos álcoois precursores (octanol e pentanol) para avaliação das interações estabelecidas em relação ao parâmetro tensão superficial. Esta avaliação foi conduzida à 25,0 ± 0,1 °C e pressão atmosférica.

3.4. Avaliação do efeito ecotóxico

3.4.1. Ensaio de germinação de sementes de *Lactuca sativa*

Os ensaios de ecotoxicidade foram realizados por meio da elaboração de soluções aquosas dos solventes eutéticos nas seguintes concentrações (mg L⁻¹): 100, 500, 1000, 10000 e 20000. Para os HDESs a faixa avaliada foi expandida para incluir as concentrações de (mg L⁻¹): 10, 30, 50, 100 e 200. Em seguida, 2 mL das respectivas soluções obtidas foram adicionados a placas de Petri de 49 x 13 mm contendo em seu interior um papel de filtro, devidamente ajustados às referidas dimensões, sobre o qual foram aleatoriamente colocadas 10 sementes de *Lactuca sativa* (Feltrin Sementes). Após o preparo, as placas foram colocadas em câmara de germinação (*SOLAB* – SL224) por 5 dias a 25,0 ± 0,1°C. Os ensaios foram realizados em duplicata e controle foi feito com a própria água utilizada na composição das soluções de estudo.

Após o período de germinação, foram medidas as porções radiculares e das raízes em cada condição investigada. Por fim, os dados foram interpolados para possibilitar o

cálculo da concentração de DES e HDES capaz de levar a uma inibição de 50% no crescimento de ambas (IC₅₀).

3.4.2. Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH)

O pH das soluções obtidas no item 3.4.1 foram medidos em um pHmetro (*Metrohm* - 713) no intuito de correlacionar esta variável aos fenômenos observados.

3.5. Avaliação da Capacidade Bactericida

A capacidade inibitória dos DESs estudados neste trabalho foi avaliada por meio do ensaio de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima (MIC), conforme descrito pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* [107]. Inicialmente, os solventes investigados foram diluídos serialmente em meio Muller-Hilton nas seguintes concentrações: 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, e 4 µg mL⁻¹. Um volume de 90 µL das soluções diluídas foram distribuídos em triplicata em microplaca de 96 poços. Em seguida, cada poço foi inoculado com 10 µL de suspensão do microrganismo patogênico teste a uma concentração aproximada de 5 x 10⁵ UFC mL⁻¹. Adicionalmente, o controle positivo utilizado foi a ampicilina nas concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56 e 0,78 µg mL⁻¹. O controle negativo consistiu em 90 µL de meio de crescimento e 10 µL de inóculo. Como branco, 100 µL de meio foram utilizados por poço em triplicata. A absorbância foi mensurada a 630 nm em leitor de Elisa (*BioteK* – ELX 800) após 24 h de incubação.

3.6. Análise Estatística dos Dados

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada através do Teste de Tukey com 95% de confiança. Esta avaliação se deu com o auxílio do software Excel da Microsoft®.

3.7. Resultados e Discussão

3.7.1. Caracterização Estrutural

A compreensão estrutural da formação dos DESs apresenta-se como sendo de suma importância não só devido aos esclarecimentos obtidos no tocante a sua obtenção, mas também em relação a sua própria aplicação nos diferentes ramos aqui já reportados uma vez que a capacidade de interação para com outros compostos/analitos se dá

mediante a formação de uma rede de ligações de hidrogênio capaz de envolver a molécula alvo [38,48,49]

A avaliação estrutural de diversos DESs, a partir da espectroscopia na região do infravermelho, vem sendo bastante reportada na literatura [108–110]. As **Figura de 10 a 12** apresentam os espectros obtidos para os sete DESs alvos do presente estudo, bem como para os específicos precursores de forma individual. É possível observar deslocamento de bandas características de alguns grupos funcionais específicos. A **Figura 10 (a)** evidencia que entre 3600-3000 cm^{-1} , relativo ao grupo hidroxila (O-H), houve não só um deslocamento como uma variação na intensidade da banda em questão quando comparado com os espectros do glicerol puro e do DESs formado a partir deste e cloreto de colina.

O fenômeno acima descrito pode estar associado à formação de ligações de hidrogênio, entre as espécies HBD e HBA. Esse fato pode restringir o grau vibracional/rotacional possível de ser acessado pela ligação química do grupo funcional durante o processo de excitação e relaxamento provocados pela exposição à radiação eletromagnética.

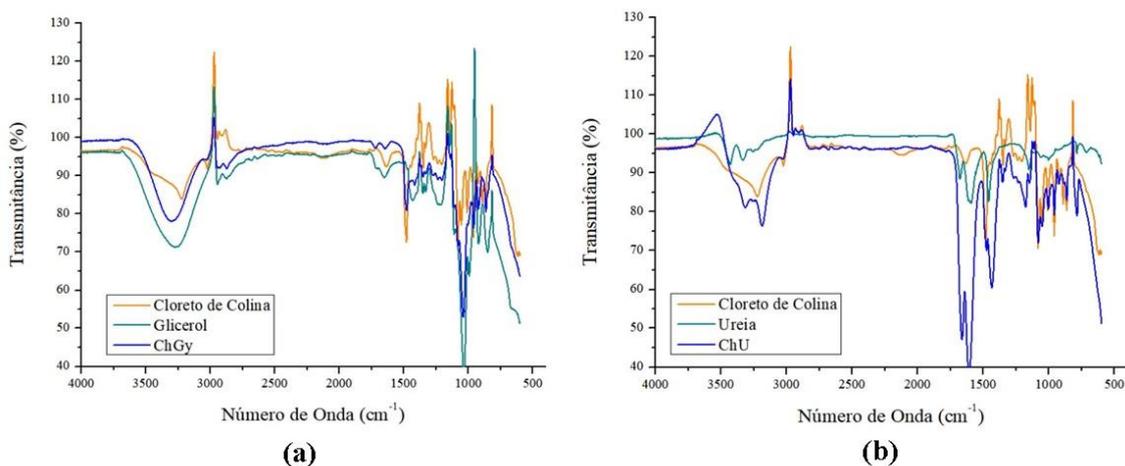


Figura 10 - Espectros de FTIR para os DESs ChGy (a) e ChU (b).

Na **Figura 10 (b)**, por sua vez, é possível observar modificações na região entre 1740-1660 cm^{-1} , a qual corresponde ao grupo C=O presente na molécula de ureia. Essa constatação pode evidenciar que essa região, eletronicamente polarizada devido ao efeito indutivo presente entre o carbono e o oxigênio duplamente ligados, é a principal envolvida na formação do DES ChU. A variação de intensidade, bem como da relativa

posição da banda em questão, se deve aos mesmos motivos mencionados no caso anterior. Na região entre $3400\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ também se observa mudanças espectrais quando se compara o espectro do ChU com o da ureia pura, o que mostra que os grupos -NH , presente nas amins da molécula, também participam da formação da conjuntura estrutural do DES aqui examinado.

Para os solventes sintetizados usando ácido láctico e/ou ácido cítrico os espectros são apresentados nas **Figuras 11 (a)-(c)**. Verificam-se duas regiões onde as variações aqui discutidas se deram de forma mais pronunciada. A primeira a ser elencada está entre $3600\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ (-OH) e a outra entre $1740\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ (-COOH), correspondentes a grupos importantes presentes nos compostos ácidos citados e diretamente associados à formação da rede de interações intermoleculares envolvidas na formação dos solventes aqui destacados [110].

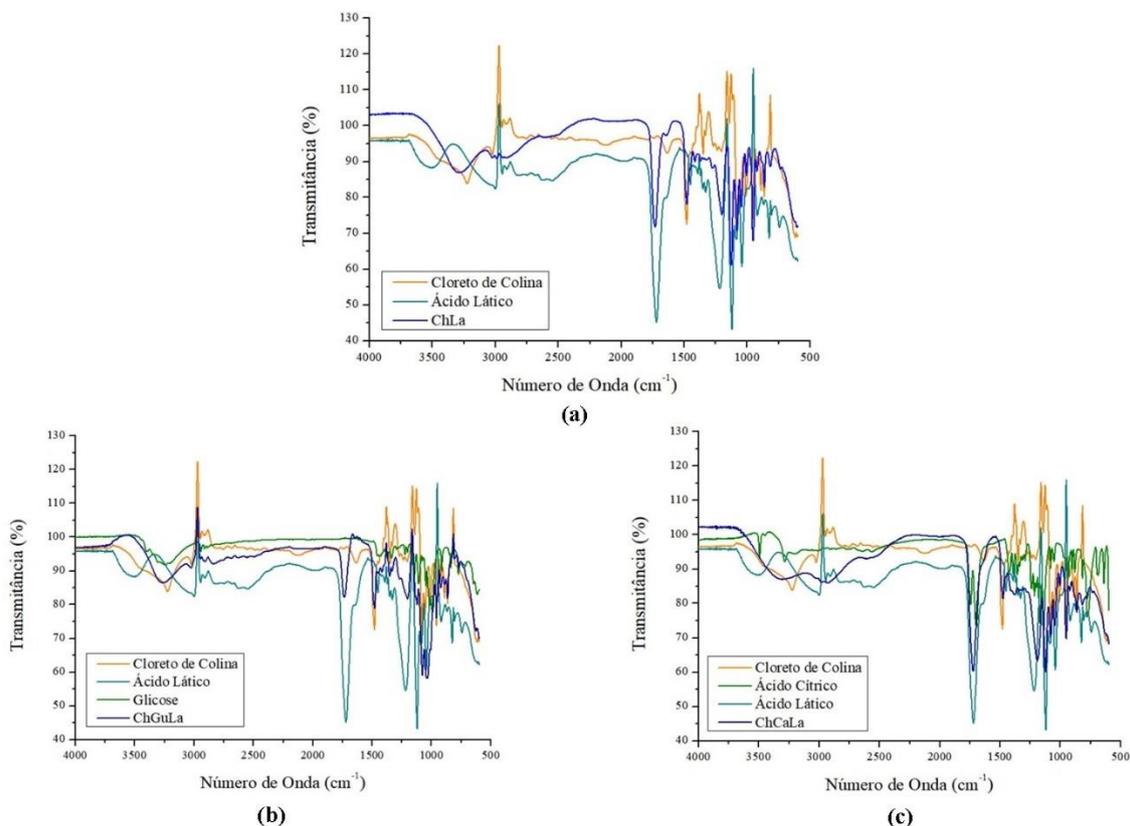


Figura 11 - Espectros de FTIR para os DESs ChLa (a); ChGuLa (b) e ChCaLa (b).

Com relação aos dois HDEs PtGyLa (**Fig. 12 (a)**) e OcGyLa (**Fig. 12 (b)**), é importante destacar que a variação na intensidade da banda entre 3600-300 cm^{-1} (O-H) se deu de forma diferenciada para ambos os solventes moleculares. Esse fato pode estar relacionado com o grau de polaridade das espécies química, pentanol e octanol, ambos apolares, o que ocasiona uma diferente interação direta com as espécies polares, glicerol e ácido láctico, levando a diferentes graus de interação/aproximação dos átomos presentes no grupo funcional em questão.

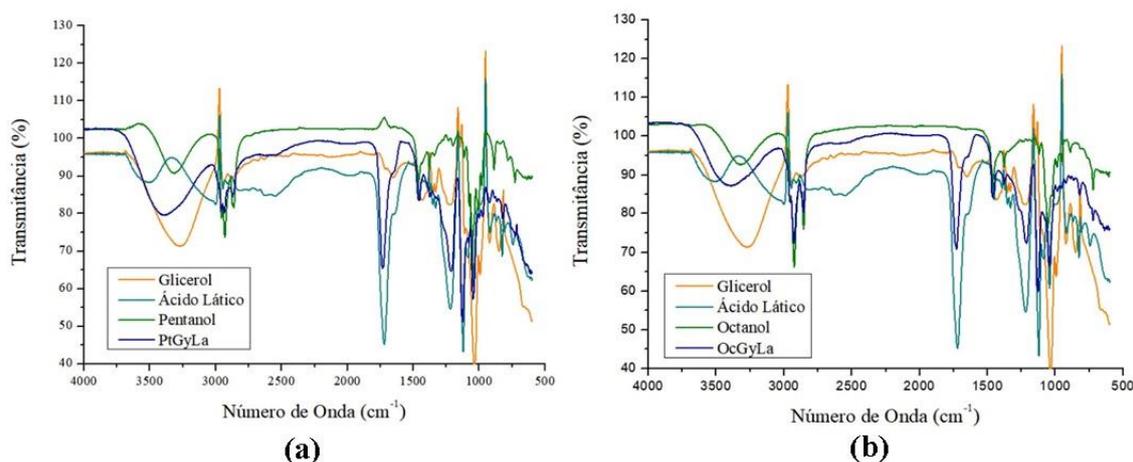


Figura 12 - Espectros de FTIR para os HDEs PtGyLa (a) e OcGyLa (b).

Há ainda na literatura poucos artigos que descrevam sobre a formação dos HDEs e sobre questões relacionadas a algumas propriedades físicas dos sistemas. O que se pode-se constatar é que não há profundo abaixamento no ponto de fusão (ponto de congelamento) do sistema, uma vez que ambos os precursores já partiram do estado líquido, à temperatura ambiente. Além disso, algumas espécies químicas não são claramente definidas nem como HBAs nem HBDs [8,41].

Para efeito de entendimento e diante dos resultados espectrais obtidos, é possível sugerir ainda que ácidos orgânicos tendem a atuar mais predominantemente como HBAs devido à considerável densidade de carga concentrado no oxigênio covalentemente ligado ao carbono sp^2 da carbonila.

A notória diversidade de matrizes amostrais presentes no cotidiano dos diversos laboratórios analíticos faz com que seja extremamente necessário a existência de um grupo de solventes dotados de ampla capacidade de ajustes, inclusive com a possibilidade de

apresentar diferentes graus de polaridade. Tal prerrogativa coloca os DESs, e suas subcategorias, como altamente interessantes para tais finalidades.

Embora os dados aqui apresentados tragam alguma clareza acerca da estrutura de diferentes DESs, e como estas repercutem sobre tais sistemas, estudos mais profundos sobre este tópico precisam ser conduzidos para que os alicerces que fundamente sua aplicação nessa área sejam mais bem estabelecidos.

3.7.2. Avaliação do Comportamento Reológico

Além da compreensão estrutural dos DESs, outro aspecto de considerável importância para melhor fundamentar sua aplicação em química analítica é o seu comportamento reológico. Devido às intensas interações atreladas ao estabelecimento dos sistemas que os formam, estes apresentam-se, em geral, como líquidos altamente viscosos à temperatura ambiente, o que pode comprometer profundamente sua aplicabilidade no estabelecimento de um novo método analítico.

A alta viscosidade pode levar a problemas amplamente conhecidos, tais como: baixa resolução cromatográfica, necessidade de alta energia para o bombeamento e escoamento do fluido, má uniformização durante a formação de aerossóis para análise por emissão/absorção atômica, bem como problemas atrelados à passagem do feixe de radiação UV-Vis durante análises espectrofotométricas. As **Figuras de 13 a 15** apresenta os resultados obtidos para os perfis reológicos dos DESs e HDESs investigados no presente estudo.

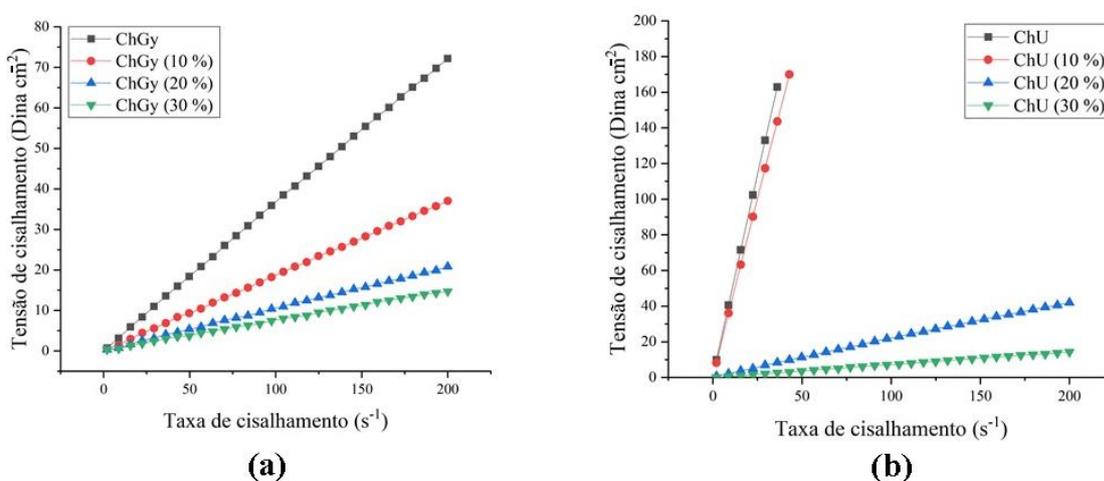


Figura 13 - Perfis reológicos para os DESs ChGy (a) e ChU (b).

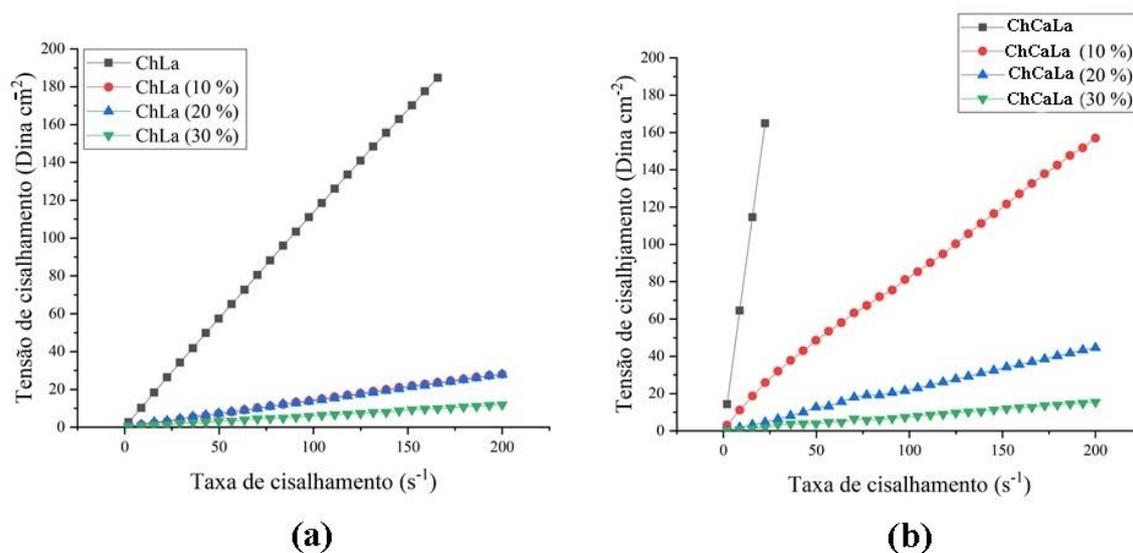


Figura 14 - Perfis reológicos para os DESs ChLa (a) e ChCaLa (b).

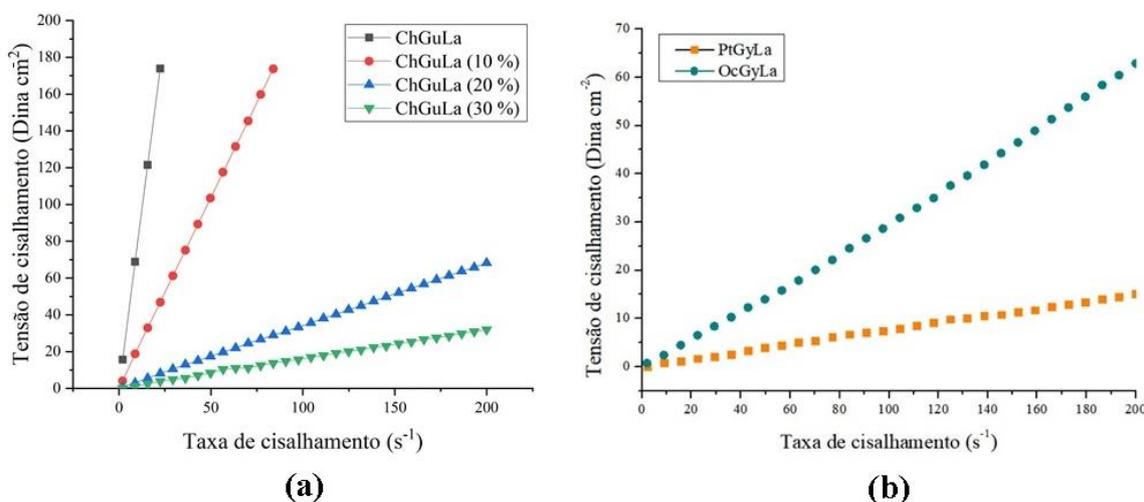


Figura 15 - Perfis reológicos para o DES ChGuLa (a) e o HDES PtGyLa/OcGyLa (b).

Outro aspecto que merece destaque diz respeito ao fato de a alta viscosidade de um solvente levar a um aumento considerável da camada limite mássica existente entre as interfaces envolvidas no processo de transferência de massa (extração), o que compromete completamente os fatores de extração. Tal problemática já tem sido inclusive reportada em alguns trabalhos na área analítica uma vez que as propriedades dos DESs, e HDESs, têm mostrado interesse, principalmente como agentes de separação [5,41,111,112].

Uma estratégia amplamente utilizada para contornar o inconveniente da elevada viscosidade tem sido a adição de água ou outros solventes que levem à sua minimização. Todavia, estudos comprovam que tal abordagem pode apresentar-se como

comprometedora da rede de ligações de hidrogênio, base da formação do solvente, uma vez que novas interações podem ser estabelecidas entre os precursores do DES e o solvente agente da diluição, ficando a recomendação de uma adição de no máximo 50% (massa massa⁻¹) [10,36,44,110].

Para fins de avaliação do perfil reológico dos solventes aqui avaliados, o ajuste ao modelo da lei de potência de Ostwald-de-Waele (**Tabela 3**), onde K (Pa.s) é índice de constância do fluido; γ é a taxa de cisalhamento (s^{-1}) e n é o índice da lei de potência que descreve o escoamento (adimensional). Para valores de $n = 1$ pode-se classificar o fluido como newtoniano, para $n \neq 1$ tem-se então o caso de um fluido pseudo-plástico ($n < 1$) ou dilatante ($n > 1$). Os resultados obtidos para os ajustes ao modelo aqui abordado estão dispostos na **Tabela 3**.

Com base nos resultados da **Tabela 3**, pode-se inferir que todos os solventes investigados podem ser considerados como newtonianos ($n \cong 1$), ou seja, que escoam à uma viscosidade constante mesmo quando ocorre um aumento na taxa de cisalhamento, independentemente da adição de água ao sistema nos diferentes teores estudados (0-30 % m m⁻¹). Todavia, para o caso do solvente ChCaLa, foi verificado que a adição de água na proporção de 10 % causou uma modificação no seu comportamento reológico, o qual variou de newtoniano ($n = 1,006$) para pseudo-plástico ($n = 0,868$).

Com os resultados apresentados pode-se inferir que o sistema, inicialmente organizado, sofreu uma perturbação considerável em sua estrutura proveniente da rede de ligações de hidrogênio entre os diferentes grupos funcionais existentes nos precursores (hidroxila e carbonila) ao passo que estes formaram novas interações com o solvente (água). Esse fato é confirmado pelo fato de que um fluido pertencente a tal categoria tem a tendência de apresentar uma desordem molecular que rapidamente orienta-se na direção de uma taxa de cisalhamento repentinamente aplicada sobre este. Devido ao menor grau de complexidade de grupos presentes nos solventes binários, estes não apresentaram tal sensibilidade.

A **Tabela 4** apresenta a viscosidade média dos solventes estudados, bem como o resultado provocado pela adição de água sobre esta variável. Vale salientar que a diminuição visualizada está de acordo com o esperado devido às razões que levam ao surgimento e à desestabilização das interações anteriormente citadas.

Tabela 3 - Coeficientes da Lei de Potência de Ostwald de Waele* e respectivos ajustes para os solventes investigados. **Nota:** Para os solventes pós-adição de água, adotou-se a seguinte representação: sigla do solvente + percentual mássico de água adicionada.

Solvent	K (Pa.s)	n	R²
ChGy	0,403	0,979	1
ChGy + 10%	0,198	0,988	1
ChGy + 20%	0,122	0,970	1
ChGy + 30%	0,089	0,966	1
ChU	4,802	0,983	1
ChU + 10%	4,280	0,979	1
ChU + 20%	0,290	0,940	1
ChU + 30%	0,074	0,993	1
ChLa	1,298	0,971	1
ChLa + 10%	0,157	0,981	1
ChLa + 20%	0,158	0,976	1
ChLa + 30%	0,065	0,982	1
ChGuLa	7,952	0,991	1
ChGuLa + 10%	2,138	0,993	1
ChGuLa + 20%	0,370	0,985	1
ChGuLa + 30%	0,185	0,971	1
ChCaLa	7,209	1,006	1
ChCaLa + 10%	1,558	0,868	1
ChCaLa + 20%	0,269	0,963	1
ChCaLa + 30%	0,092	0,966	1
PtGyLa	0,068	1,030	1
OcGyLa	0,201	1,084	1
Água	0,009	0,955	1

*Lei de Potência de Ostwald de Waele: $\tau = K \cdot \gamma^n$.

Tabela 4 - Viscosidades médias mensuradas para os DESs e HDESs investigados nas diferentes condições

Solvente	Viscosidade (cp)
ChGy (a)	$36,72 \pm 0,49^{*,b,c,d}$
ChGy + 10% (b)	$18,99 \pm 1,75^{*,a,c,d}$
ChGy + 20% (c)	$10,82 \pm 1,55^{*,a,b,d}$
ChGy + 30% (d)	$8,02 \pm 2,04^{*,a,b,c}$
ChU (a)	$461,56 \pm 5,39^{*,b,c,d}$
ChU + 10% (b)	$402,39 \pm 5,31^{*,a,c,d}$
ChU + 20% (c)	$22,72 \pm 2,90^{*,a,b,d}$
ChU + 30% (d)	$6,85 \pm 1,33^{*,a,b,c}$
ChLa (a)	$114,93 \pm 3,66^{*,b,c,d}$
ChLa + 10% (b)	$14,82 \pm 2,49^{*,a,d}$
ChLa + 20% (c)	$14,52 \pm 1,09^{*,a,d}$
ChLa + 30% (d)	$6,58 \pm 2,35^{*,a,b,c}$
ChGuLa (a)	$777,66 \pm ,65^{*,b,c,d}$
ChGuLa + 10% (b)	$208,04 \pm 1,95^{*,a,c,d}$
ChGuLa + 20% (c)	$34,70 \pm 0,82^{*,a,b,d}$
ChGuLa + 30% (d)	$15,95 \pm 1,41^{*,a,b,c}$
ChCaLa (a)	$728,35 \pm 8,24^{*,b,c,d}$
ChCaLa + 10% (b)	$91,58 \pm 17,22^{*,a,c,d}$
ChCaLa + 20% (c)	$21,87 \pm 4,29^{*,a,b,d}$
ChCaLa + 30% (d)	$8,08 \pm 0,85^{*,a,b,c}$
PtGyLa	$7,35 \pm 1,42^{*+}$
OcGyLa	$29,83 \pm 1,81^{*+}$

(*) – Diferença estatística em relação à viscosidade da água ($1,11 \pm 0,36$ cp) ($p < 0,05$).

(+) – Diferença estatística em relação ao outro HDES ($p < 0,05$)

Letras diferentes (a,b,c e d) indicam diferenças estatísticas entre os valores ($p < 0,05$).

Ainda dentro do tópico em questão, a **Tabela 4** revela que os DESs binários (ChGy, ChLa e ChU) apresentaram uma menor viscosidade quando comparados aos DESs ternários (ChGuLa e ChCaLa). Tal resultado se deve provavelmente ao aumento do número de sítios capazes de compor ligações de hidrogênio dentro da estrutura do solvente como um todo. Entre os binários, destaca-se ainda que o ChU ($461,56 \pm 5,39$ cp) e o ChLa ($114,93 \pm 3,66$ cp) apresentaram os maiores valores dentro o grupo, respectivamente. Tal resultado pode ser fruto da interação semi-coulumbica que ocorre devido à polarização indutiva que existe entre o carbono e o oxigênio presentes no grupo carbonila, o que potencializa possíveis interações envolvendo este sítio. Essa constatação é fortemente reforçada quando se verifica que a mesma razão química pode explicar a maior viscosidade dos DESs ternários frente aos binários, pois não só no número de sítios aumenta como também todos os HBD apresentavam o grupo C=O em sua estrutura química.

Para os solventes de caráter apolar (HDESs), é importante destacar que seus álcoois precursores se apresentaram instáveis devido a suas altas volatilidades, o que impediu a aferição de seu comportamento reológico individualmente. A maior estabilidade apresentada pelos solventes PtGyLa e OcGyLa se deve então à formação das interações que levam ao surgimento do sistema, o que ocasiona uma considerável redução das pressões de vapores dos solventes quando se compara às do pentanol e octanol separados, fazendo com que estes suportem o calor dissipado durante o fornecimento das diferentes tensões de cisalhamento impostas aos solventes durante a análise.

O abaixamento da pressão de vapor apresentado pelos sistemas eutéticos é um fator que valida seu uso em química analítica uma vez que solventes muito voláteis tendem a ser difíceis de manejar, além de poderem provocar flutuações consideráveis à concentração das amostras o que leve a severos erros sistemáticos. Além disso, a crescente necessidade de automação das análises em fluxo faz com que o conhecimento da reologia dos fluidos se torne um conjunto de informações imprescindíveis inclusive para avaliação do requerimento energético atrelado ao bombeamento/escoamento em todo equipamento.

Por fim, vale ressaltar que a compreensão dos aspectos hidrodinâmicos é fundamental para estabelecer qualquer metodologia analítica, principalmente quando se está usando solventes como os DESs devido às limitações aqui registradas. No trabalho de Dogan et al. (2020) [54] foi relatada uma perda do sinal analítico quando as amostras

foram analisadas por espectrofotometria UV-Vis após diluição em solventes eutéticos. A diluição dos extratos foi conduzida devido à dificuldade de realizar leituras de amostras muito viscosas no instrumento. Neste caso, o ideal teria sido realizar uma prévia avaliação reológica do solvente para em seguida empregá-lo no preparo de amostras para evitar dificuldades no momento da análise.

Outra questão relevante tem sido o uso de DESs como adjuvantes de fase móvel em cromatografia [113–116]. Tal procedimento, a depender da adição realizada, pode estar simplesmente resultando numa solução dos precursores do solvente diluídos nos componentes da fase móvel. Estudos mais atuais estão se concentrando em utilizar DESs puros, ou pouco aditivados de água e/ou outros solventes, para que sejam preservadas suas características e aplicações [114,116]. Por meio do presente estudo, é notório que tal abordagem deve ser atrelada a um estudo reológico e de manutenção da estrutura inicial de(os) solvente(s).

3.7.3. Avaliação da Tensão Superficial

Outra propriedade físico-química de extrema relevância no tocante ao uso de um fluido no desenvolvimento de um método analítico é a sua tensão superficial, pois é sabido que fluidos que apresentem elevados valores para este parâmetro tendem a apresentar complicações quando analisados por métodos espectroanalíticos uma vez que esta inclui uma etapa de geração de aerossóis formados de pequenas gotículas do analito em solução, o que não ocorre de forma eficiente quando altas tensões superficiais predominam [7].

O preparo de amostras, fluidas ou sólidas, que necessitam de uma etapa de extração também pode ser prejudicado quando solventes com altas tensões superficiais são utilizados, pois o contato com a amostra tende a ser comprometido, levando a baixos percentuais extrativos. Se esta etapa for assistida por ultrassom, as altas viscosidades levam a uma diminuição da pressão de formação das microbolhas, o que levará a menores impactos para com a matriz amostral [7]. A **Figura 16 (a)** e **(b)** apresentam os valores obtidos para os DESs polares e apolares avaliados no presente estudo, respectivamente.

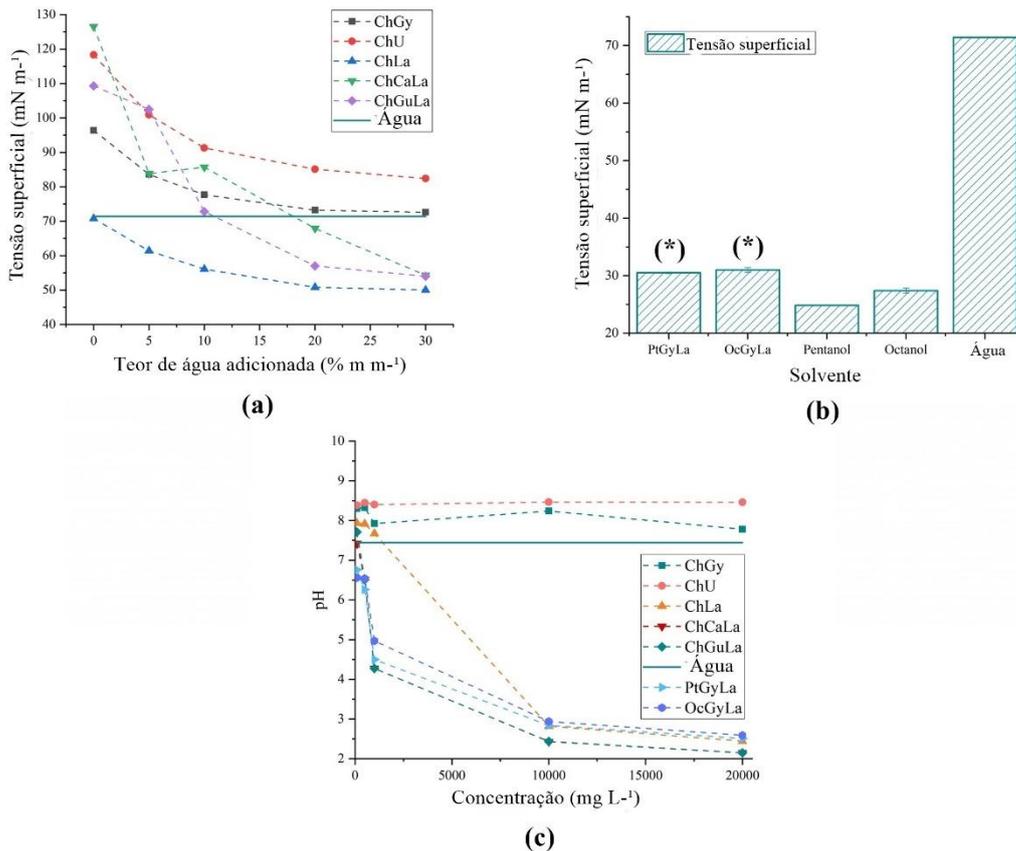


Figura 16 - Comportamento da tensão superficial em função da adição de água para os DESs investigados (a), tensão superficial dos HDESs e seus hidrocarbonetos precursores (b) e pH das soluções aquosas dos sistemas eutéticos obtidos. **Nota:** O símbolo (*) denota que há diferença estatística em relação ao relativo álcool precursor.

Como é possível observar na **Figura 16 (a)**, com exceção do DES ChLa, todos os demais apresentaram uma tensão superficial superior à da água pura, sendo o limiar desta constatação verificado até a adição de 10 % (m m⁻¹) de água aos sistemas. Para os DESs ChU e ChGy, valores de tensão superficial foram superiores mesmo após adição de água de 30 % (m m⁻¹). O resultado obtido indica que o caráter eletrostático pronunciado na interação cloreto de colina-ureia, bem como a presença de três sítios doadores de ligação de hidrogênio no glicerol, pode ser apontados como a razão de tal resultado.

Ambos os DESs ternários apresentaram uma considerável mitigação de suas tensões superficiais após a adição de água 10 % (m m⁻¹), o que indica que o efeito da ação deste solvente sobre os DESs leva a formação de um sistema tensoativo capaz de reduzir as tensões do próprio solvente progressivamente adicionado. Esse resultado

pode ser justificado por uma maior difusividade do ácido lático em água, o que leva a um rápido desfazimento da rede de interações estabelecida nos sistemas eutéticos.

A **Figura 16 (b)** evidencia que ambos HDEs, PtGyLa e OcGyLa, apresentaram uma maior tensão superficial em relação aos seus álcoois precursores. Este resultado se deve às evidentes interações estabelecidas entre as espécies HBDs e HBA. Todavia, também apresentaram valor inferior quando comparados com a água e isso pode ser atrelado ao fraco caráter das interações do tipo forças de London, predominantes em sistemas apolares.

Uma vez que tensão superficial e viscosidade são propriedades fortemente afetadas pelas interações intermoleculares estabelecidas por um sistema, é interessante destacar que o DES ChCaLa também apresentou uma variação positiva anômala ao adicionar-se água no teor de 10 % (m m⁻¹), uma vez que um decaimento era esperado. A mesma justificativa dada para a variação no comportamento fluidodinâmico reportada na seção anterior pode ser aqui adotada para efeitos de compreensão do fenômeno observado.

As constatações obtidas para o comportamento dos diferentes DESs estudados no presente trabalho estão dentro do reportado na literatura para sistemas a composições diferentes [117,118]. Adicionalmente, as informações também podem servir de norte para uso de DESs em etapas de preparo de amostra e/ou quantificação instrumental mediante adequados ajustes nesta propriedade de elevada importância.

3.7.4. Avaliação do caráter fitotóxico

Desde seu surgimento na literatura, o rótulo de “solventes verdes” foi deliberadamente empregado para designar os DESs de um modo geral. Todavia, muitos questionamentos vêm sendo levantados acerca do quão verde estes são de fato [13,49,119]. As **Figura 17 e 18** apresentam resultados obtidos para o efeito fitotóxico dos DESs aqui investigados em relação à germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*). A **Figura 19** apresenta o resultado do cálculo da concentração de solvente molecular capaz de levar a 50 % de inibição do crescimento vegetal (IC₅₀).

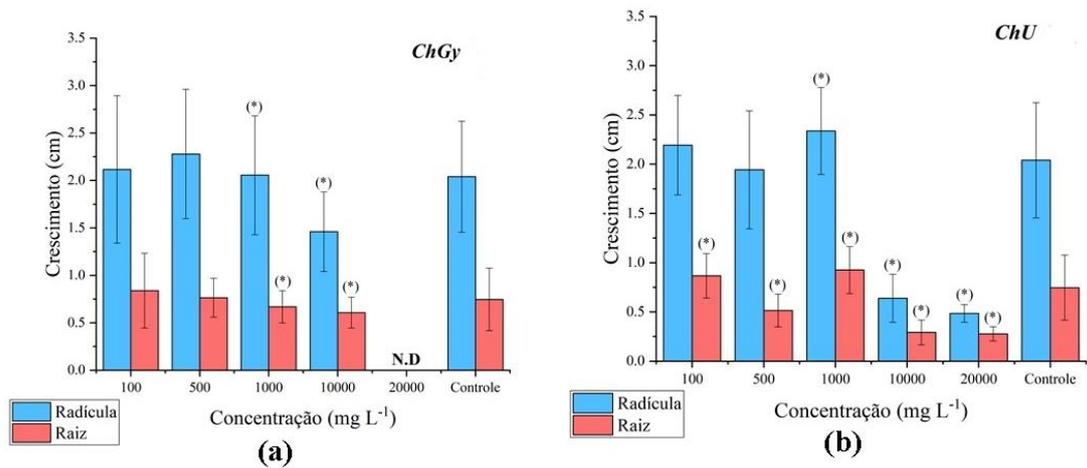


Figura 17 - Comportamento fitotóxico dos DESs ChGy (a) e ChU (b). Nota: O símbolo (*) indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle e "N.D" significa "Não Determinado" para os casos onde nenhum crescimento foi observado.

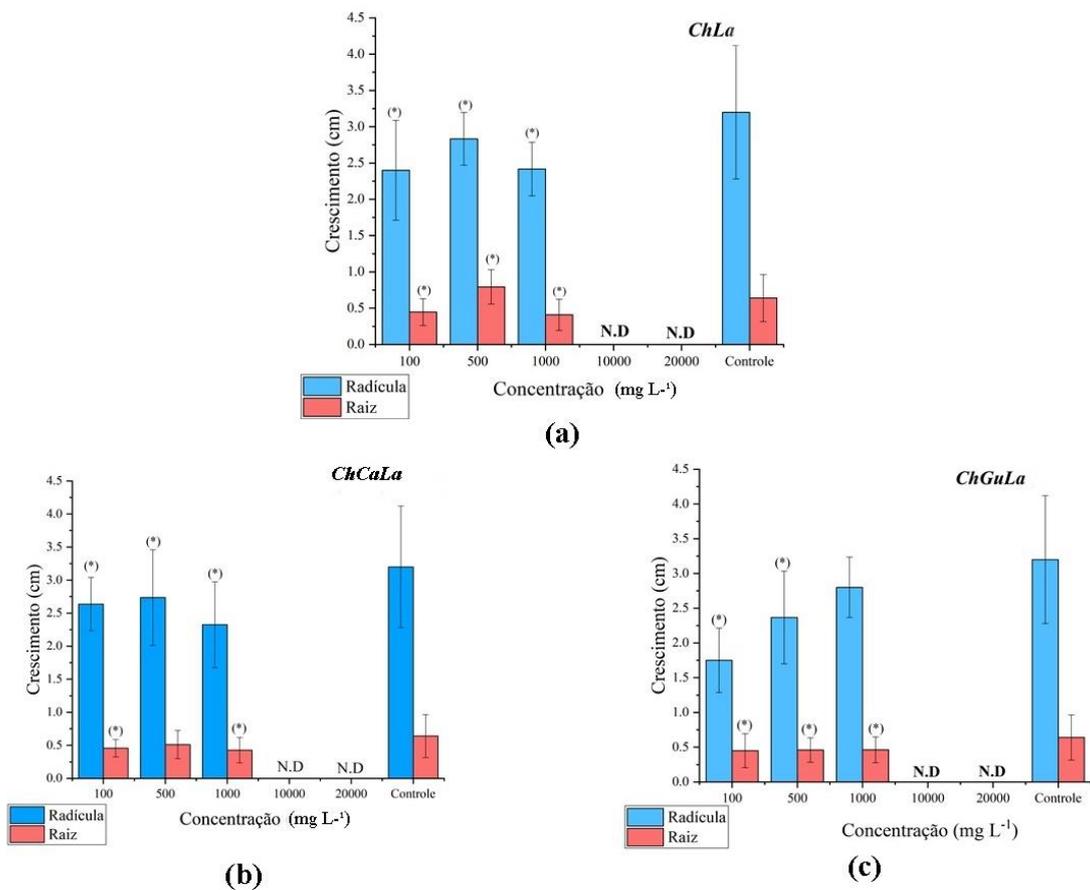


Figura 18 - Comportamento fitotóxico dos DESs ChLa (a), ChCaLa (b) e ChGuLa (c). Nota: O símbolo (*) indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle e "N.D" significa "Não Determinado" para os casos onde nenhum crescimento foi observado.

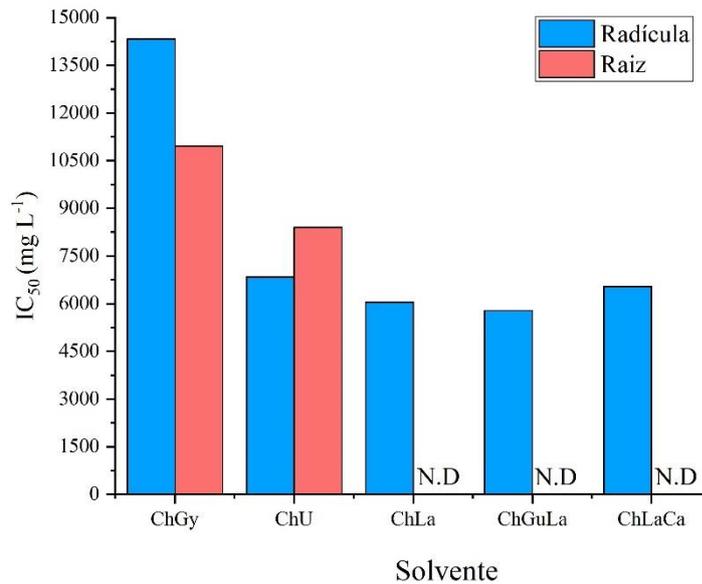


Figura 19 - Valores de IC_{50} calculados para os ensaios de fitotoxicidade. **Nota:** "N.D" significa "Não Determinado" para os casos onde nenhum crescimento foi observado.

Como é possível observar na **Figura 17 (a)**, a inibição da porção radicular, do biomodelo aqui investigado, em relação ao solvente ChGy, teve início a partir de 1000 $mg L^{-1}$ o que, para o ChU (**Figura 17 (b)**), se deu de forma contrária pois, até a relatada concentração, um significativo crescimento ($p < 0,05$) foi notado. Estes resultados demonstram claramente que a composição relativa do DES pode potencializar seu efeito antagônico ao desenvolvimento de células vegetais. A presença de três grupos hidroxila no HBD do ChGy tende a potencializar a interação deste para com os constituintes do envoltório biológico formado pelas células deste biomaterial, o que pode levar a uma maior dissolução desta estrutura e conseqüente inibição do seu desenvolvimento. Já com relação ao ChU, é sabido que seu HBD é amplamente empregado como fertilizante no setor agrícola, o que explica sua tendência de promover o crescimento vegetal. Todavia, em concentrações mais elevadas (acima de 10000 $mg L^{-1}$) uma perturbação do próprio equilíbrio de germinação é notada, devido a uma possível eutrofização do meio de cultura vegetal, o que pode justificar o efeito inibitório observado a partir desta.

As constatações acima citadas estão em concordância com os resultados de Wen et al. (2015) [49], os quais verificaram, através de micrografias eletrônicas, danos morfológicos à estrutura do tecido vegetal de *A. sativum* (alho), principalmente para o solvente eutético obtido a partir de glicerol como HBD. Além disso, assim como sugerido pelos dados aqui reportados, diferenças significativas podem ser atribuídas ao

mecanismo de ação dos DESs durante a inibição do crescimento vegetal, o que depende claramente da sua composição.

Todos os solventes obtidos a partir do ácido láctico ($pK_a = 3.85$) como HBD apresentaram maior efeito inibitório (**Figuras 18 (a-c)**), o que pode ser atrelado ao fato do referido ácido orgânico apresentar uma considerável acidez, o que faz com que, ao ser desfeito o sistema eutético pela adição de água, este induza a formação de íons H_3O^+ em solução. Este fator faz com que o ambiente de germinação se mostre pronunciadamente oxidante, levando assim ao comprometimento das células das sementes alface.

Em especial para o solvente ChGuLa (**Figura 18 (c)**), o efeito oxidante do ácido láctico foi minimizado por este não ser o componente majoritário do sistema, sendo esse papel desempenhado pela glicose (**Tabela 2**), a qual inclusive pode ter atuado como fertilizante natural.

Com relação à determinação da IC_{50} (**Figura 19**), não foi possível ser realizada para todos os solventes à base de ácido láctico, com relação à raiz, o que pode ser atribuído ao fato desta porção estar diretamente em contato com a solução oxidante formada e assim sentir seu efeito antagônico. Para os HDESs, PtGyLa e OcGyLa, uma total inibição foi constatada até mesmo na menor concentração avaliada, o que denota um maior caráter ecotóxico a estes, sendo esse efeito muito provavelmente oriundo da presença dos álcoois de cadeia longa empregados em sua síntese.

Todos os DESs hidrofílicos apresentaram IC_{50} acima de 5000 mg L^{-1} para a porção radicular, o que os tornam levemente ecotóxicos a depender de sua concentração no efluente. Os solventes ChGy e ChU apresentaram IC_{50} acima de 80 mg L^{-1} para as raízes de alface, o que os configura com os menos fitotóxicos dentre os investigados.

Resultados similares aos aqui obtidos foram reportados por Rodosevic et al. (2015) [13], tendo estes constatados que DESs à base de cloreto de colina apresentaram valores de IC_{50} acima de 5000 mg L^{-1} para sementes de *T. aestivum* (trigo). Segundo os mesmos pesquisadores, dentre os DESs investigados, o de maior efeito fitotóxico foi verificado para o sistema formado a partir de cloreto de colina e ácido oxálico ($pK_a = 1.25$) e isso se deu devido ao fato de as soluções aquosas deste apresentarem pH muito baixos para concentrações acima de 1000 mg L^{-1} . Esta constatação corrobora com os dados obtidos na presente pesquisa uma vez que todos os DESs formados a partir de ácido láctico como

HBD apresentaram baixos valores de pH para concentrações na mesma faixa (**Figura 16 (c)**).

Além do efeito atrelado ao balanço oxi-rodox na interface célula vegetal/ solução aquosa de DES, ao observar-se o efeito da tensão superficial do sistema DESs-água (**Figura 16 (a)**), é possível ainda inferir que o efeito tensoativo destes sobre o solvente universal tende a aumentar a difusividade de espécies em solução para a superfície, e interior, das células que compõem a estrutura vegetal. Os DESs à base de ácido láctico foram os que apresentaram tal comportamento, ao passo que o teor de água fora aumentado, o que também pode agregar à compreensão de seu maior efeito fitotóxico.

Os resultados reportados na presente seção despontam para a questão do uso indiscriminado de DESs e/ou HDESs na elaboração de metodologias analítica verdes, pois, a geração de grandes efluentes contendo estes solventes tende a levar a um meio com considerável efeito ativo ao equilíbrio de germinação de matrizes vegetais.

3.7.5. Avaliação da capacidade bactericida

Outro parâmetro interessante para a compreensão dos impactos ambientais advindos do descarte de certos fluidos nos ecossistemas é sua ação frente bactérias, uma vez que estas habitam os mais diversos biomas naturais. Sendo assim, para efeito de estudos, foram selecionadas quatro cepas de bactérias, sendo duas gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella e. typhimurium*) e as outras gram-positivas (*Bacillus sp* e *Staphylococcus aureus*), todas comuns às mucosas animais e diversas superfícies naturais.

Os dados da **Tabela 5** mostram que ambos os DESs ChGy e ChU apresentaram menor efeito citotóxico às células bacterianas utilizadas como biomodelos uma vez que apresentaram maiores valores de MIC. Embora ambos os solventes tenham agido de forma semelhante para as células de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus sp*, com valores de MIC iguais a 125 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente, uma discrepante diferença foi notada em relação às células gram-negativas.

Tabela 5 - Resultados da concentração inibitória mínima (MIC) apresentada pelos diferentes sistemas eutéticos estudados.

Solvente	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus sp</i>	<i>Salmonella e. typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>
ChGy	>125	>250	>500	>250
ChU	>125	>250	>125	>125
ChLa	N.D	N.D	N.D	N.D
ChGuLa	>8	>16	>16	>16
ChCaLa	N.D	N.D	N.D	>8
PtGyLa	>8	>8	>8	>8
OcGyLa	N.D	N.D	N.D	N.D

O fato das cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella e. typhimurium* terem sido mais resistentes ao efeito bactericida de ambos os solventes é esperado uma vez que estas apresentam, em suas paredes celulares, uma constituição lipoproteica mais complexa. Todavia, a diferença notada nas MIC do ChGy (250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) frente às do ChU (125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para ambas) pode ser atribuído ao fato do glicerol ser um constituinte presente na própria estrutura celular de bactérias em geral, sendo assim mais biocompatível (menos tóxicos) a estas.

Todos os DESs obtidos com uso de ácido láctico como HBD apresentaram elevada toxicidade às células bacterianas, o que pode ser atribuído a uma maior difusão deste constituinte para o interior celular e o acarretamento de um deslocamento do equilíbrio ácido-base regulador dos metabolismos dos biomodelos. Isso pode ser atribuído ao fato das células apresentarem inibição até mesmo nas menores concentrações investigadas, com exceção da *Escherichia coli* que a fez no limiar avaliado (>8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para o ChCaLa.

Entre os HDESs avaliados, é notório que o OcGyLa apresentou mais atividade bactericida que o PtGyLa uma vez que sua MIC se apresentou em concentrações abaixo da faixa aqui investigada. Este resultado pode ser atribuído ao aumento da cadeia alquila do HBA empregado na obtenção de ambos os solventes uma vez que isso aumenta o grau de hidrofobicidade. O pronunciamento da apolaridade do solvente OcGyLa pode ter levado a uma maior dissolução da parede celular das células investigadas uma vez que está é basicamente constituída por uma composição lipoproteica insolúvel em meios polares.

Embora a diluição dos DESs possa ter levado ao desfazimento de sua estrutura como um todo, em diferentes graus a depender de sua composição, o efeito biológico observado pode ser atribuído à direta interação estabelecida entre seus constituintes e o envoltório biológico das células devido a um sinérgico efeito destes em meio aquoso. Segundo Lapeña et al. (2021) [48], o efeito citotóxico dos DESs por eles investigados sobre células bacterianas (*A. fischeri*) pode ser atribuído de fato a um desbalanço na proporção de solvente molecular/nutrientes presentes no meio de cultura, para além da referida interação.

Os resultados reportados por Radosevic et al. (2018) [38] corroboram com as constatações aqui apresentadas uma vez que estes concluíram que o aumento de grupos hidroxilas (-OH) na composição dos DESs leva a um aumento da sua capacidade bactericida, quando esta tem maior caráter ionizável. Este fato leva a uma diminuição do pH do meio de cultura e conseqüente oxidação dos sistemas vivos nele presentes, o que está de acordo com o pronunciado efeito dos solventes à base de ácido láctico (**Tabela 3**).

Dados reportados no trabalho de Silva et al. (2019) [112] evidenciam o fenômeno observado entre os solventes OcGyLa e PtGyLa pois estes também concluíram que o aumento da hidrofobicidade, de DESs à base de ácidos graxos, leva não só a uma dissolução da parede celular microbiana como também aumenta a difusividade dos constituintes exteriores a esta.

Considerações Finais

Os resultados apresentados neste capítulo contribuem significativamente para a compreensão acerca do uso dos DESs e HDESs como agentes extratores para o preparo de amostras dentro de uma perspectiva de uma química analítica verde. A caracterização estrutural aqui reportada corrobora o comportamento reológico verificado nos sistemas aqui estudados, os quais contribuem para elucidação do comportamento fluidodinâmico de cada um deles, uma vez que este é uma repercussão das interações entre os grupos funcionais presentes em seus precursores.

Com respeito à ecotoxicidade, por meio dos resultados deste estudo é claramente demonstrado que há uma vantagem no uso desta classe de solventes moleculares em relação aos tradicionais solventes orgânicos, os quais são amplamente reconhecidos como poluidores e perigosos. No entanto, o uso indiscriminado de DESs e HDESs pode

levar também a consideráveis danos ambientais. Por isso, recomenda-se que estes solventes sejam usados em microescala para evitar-se a formação de grandes volumes de efluentes. Desta forma, os solventes aqui estudados se configuram como uma possibilidade para a implementação de uma química analítica verde por meio de novos métodos que possam substituir os já estabelecidos.

~ CAPÍTULO 4 ~

*Uso de Solventes Eutéticos Profundos
(DESs) Ternários na Extração de
Compostos Fenólicos em Amostras de
Resíduo de Abacaxi (Ananas comosus)*

Capítulo 4 – Uso de Solventes Eutéticos Profundos (DESs) Ternários na Extração de Compostos Fenólicos em Amostras de Resíduos de Abacaxi (*Ananas comosus*)

O presente capítulo apresenta os resultados obtidos para a avaliação realizada sobre o uso de solventes eutéticos profundos (DESs), sobretudo os ternários, como agentes extratores de compostos fenólicos presentes em amostras de resíduos de abacaxi através de um processo de extração sólido-líquido assistido por vórtex para quantificação através da espectrofotometria UV-Vis. Os dados dos ensaios preliminares apontaram que, dentre os sistemas avaliados, o DES ChGuLa apresentou um melhor desempenho extrativo em termos de fenólicos totais ($109,30 \pm 9,06 \text{ mgEAG g}^{-1}_{\text{amostra}}$), sendo este resultado corroborado pelas caracterizações das amostras sólidas, antes e após cada extração, por meio da quantificação de seus teores de lignina e suas caracterizações por espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e microscopia de varredura eletrônica (MEV). Por fim, uma otimização do método extrativo foi realizada por meio de um delineamento composto central (DCC), onde as principais variáveis de processo (adição de água ao DES, tempo de extração, temperatura e massa de amostra) foram investigadas, sendo a melhor condição ($226,37 \pm 9,50 \text{ mgEAG g}^{-1}_{\text{amostra}}$), dentre as realizadas, aquela conduzida a 35% de adição de água, 3 mL de solvente, 65 °C, 0,15 g de amostra e durante 90 min. O resultado obtido na condição otimizada foi superior inclusive ao uso de uma tradicional solução hidroetanólica a 70% v v⁻¹ ($190,53 \pm 9,37 \text{ mgEAG g}^{-1}_{\text{amostra}}$).

Palavras-chaves: composto fenólicos, bioanalitos, bioquímica analítica, extrações verdes e delineamento composto central.

4. Materiais e Métodos

4.1. Coleta e pré-processamento das amostras de resíduo de abacaxi

A amostra de resíduo de abacaxi (casca e coroa) foi coletada no dia 18 de maio de 2023 na indústria de polpa de frutas Intrafrut, a qual se encontra localizada no Distrito Industrial da cidade de João Pessoa – PB. O material coletado foi seco em estufa de circulação (*Splabor* – SP-102) a 60 °C por 4 dias, até massa constante. Em seguida, a amostra foi moída em moinho de facas e homogeneizada por peneiramento, sendo coletada a fração com diâmetro de partícula inferior a 25 mesh (0,707 mm).

4.2. Caracterização físico-química da amostra laboratorial

4.2.1. Determinação do potencial hidrogeniônico (pH) e do teor de sólidos solúveis

A determinação do pH e do teor de sólidos solúveis da amostra de resíduo de abacaxi foi realizada por meio da medição direta de um lixiviado obtido utilizando-se uma razão massa de amostra/água de 1:10 (m v⁻¹) à 25 °C, 1 atm e sem realização de agitação mecânica, conforme estabelecido pelo protocolo do Instituto Adolf Lutz (2008) [120]. Para medição do pH utilizou-se um pHmetro da marca *MS TECPON* modelo LUCA 2010, para o caso dos sólidos solúveis utilizou-se um refratômetro da marca *Smart*, modelo 1-Atago-nº 3150. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.2. Determinação do teor de açúcares redutores totais livres

A determinação do teor de açúcares redutores totais livres (ARTL) na matriz amostral foi realizada por meio da quantificação dos ARTL presentes no extrato obtido no item 4.2.1. Para tal, 0,5 mL do extrato aquoso foi misturado com 0,5 mL de uma solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em tubos de vidro de 10 mL. Em seguida, o sistema reacional foi aquecido a 100 °C, em banho térmico (*SOLAB* – SL 152) por 10 minutos. Por fim, o sistema foi diluído pela adição de 4 mL de água destilada e sua absorbância foi então mensurada em espectrofotômetro (*QUIMIS* – U2M) a 540 nm. A conversão das absorbâncias medidas em concentração (mg mL⁻¹) foi feita com auxílio da curva analítica previamente construída utilizando-se glicose (Sigma Aldrich, pureza ≥ 99%) a uma faixa, de concentração de 0,1 a 1 mg mL⁻¹, como padrão, conforme estabelecido pelo protocolo da EMBRAPA (2013) [121]. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Para elaboração dos brancos analíticos, realizou-se o mesmo procedimento utilizando água deionizada em lugar das soluções de padrão ou amostras.

4.3. Preparo dos solventes eutéticos profundos (DESS)

Com base nos resultados obtidos no capítulo 3 foram selecionados os seguintes DESS para o presente estudo: ChLa, ChGuLa e ChCaLa. Os três agentes extratores foram preparados conforme reportado na seção 3.2 do capítulo anterior.

4.4. Ensaios preliminares da extração sólido-líquido assistido por vórtex

Para investigar, de forma preliminar, a capacidade extratora dos sistemas eutéticos selecionados, foi selecionada uma condição padrão onde 3 mL de cada DES (adicionado de 10% de água $m\ m^{-1}$) foram adicionados a um tubo cônico plástico contendo 0,3 g de amostra (razão amostra-solvente de 1:10 $m\ v^{-1}$). Em seguida, os sistemas foram colocados em banho térmico (*SOLAB* – SL 152) a 60 °C por 1 h, sendo realizadas periódicas agitações em vórtex a cada 10 min. Como comparativo, um análogo sistema foi elaborado utilizando-se como agente extrator uma solução de etanol 70 % ($v\ v^{-1}$), uma vez que esta é uma solução comumente empregada para esta finalidade [122]. Ao final das extrações, os tubos foram centrifugados (*Excelsa II* – 206 BL) por 10 min a 2500 rpm ($F_g = 1090\ g$) para promover a separação entre as fases sólidas (amostras pós-extração) e fluidas (extratos). Todos os ensaios extrativos foram realizados em quintuplicata para que houvesse material suficiente para as caracterizações subsequentes.

4.5. Quantificação do teor de fenólicos totais nos extratos obtidos

A quantificação do teor de fenólicos totais nos extratos obtidos foi realizada de acordo com o protocolo em microplacas, para o método do Folin-Ciocalteu, proposto por Pires et al. (2017) [123]. Para tal, soluções de 1 mg de amostra por mL de água deionizada foram preparadas. Em ambiente escuro, 500 μL do reagente Folin-Ciocalteu a 10% ($v\ v^{-1}$) foram adicionados a microtubos, seguidos da adição de 120 μL das amostras e de 400 μL de solução de CaCO_3 a 10 % ($m\ v^{-1}$). Passados 120 min de reação, 200 μL dos meios reacionais foram transferidos para microplacas, sendo então as leituras realizadas em um espectrofotômetro de placas (*BIOTEK* – H1M), observando o sinal analítico a 765 nm. Para construção dos brancos analíticos, o mesmo sistema fora montado substituindo-se a adição do reagente pela de água deionizada. Todas as quantificações foram realizadas em triplicata.

4.6. Caracterização estrutural das amostras de resíduo de abacaxi antes e após as extrações preliminares

As amostras de resíduo de abacaxi foram caracterizadas quanto ao seu teor de lignina e estrutura físico-química, antes e após os ensaios preliminares de extração, a saber:

4.6.1. Determinação do teor de lignina Klason

O teor de lignina presente nas amostras, antes e após os ensaios de extração sólido-líquido, foi determinado pelo método padrão desenvolvido pelo *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) [124]. O qual consiste na dissolução ácida de cerca de 0,3 g das amostras em 3 mL solução de H₂SO₄ (72% v v⁻¹), ambos foram colocados em um Erlenmeyer de 125 mL e em banho térmico a 30 °C por 1 h. Em seguida, 82 mL de água deionizada foram adicionados ao sistema e a amostra permaneceu por mais 1h em autoclave a 120 °C, sendo então finalizado pela filtração da lignina insolúvel no meio ácido. Por fim, o sólido obtido é seco em estufa de circulação a 105 °C por 24h. O teor de lignina é então quantificado conforme a **Equação 1**. Todas as quantificações foram realizadas em triplicata.

$$\text{Teor de Lignina (\%)} = \frac{\text{massa de lignina filtrada (g)}}{\text{massa inicial de amostra (g)}} \times 100\% \quad \text{(Equação 1).}$$

4.6.2. Caracterização estrutural das amostras por espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização estrutural das amostras do resíduo aqui estudado foi também realizada por meio da obtenção de espectros, das frações sólidas antes e após as extrações, por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR) em um equipamento *SHIMADZU – IRPrestige21*. Os espectros foram obtidos na faixa de 4000 a 600 cm⁻¹, com uma resolução de 4 cm⁻¹ e 4 varreduras.

4.6.3. Caracterização por microscopia de varredura eletrônica (MEV)

As imagens de microscopia de varredura foram adquiridas utilizando um microscópio com fonte de emissão por campo (FEG) (*TESCAN – MIRA3 LMH*), operado a uma aceleração de 20 kV e equipado com detector de energia dispersiva de raios-X e um detector de elétrons difratados (EBSD) (*Oxford, ULTIM MAX 65*).

4.7. Otimização estatística da extração de compostos fenólicos presentes nas amostras de resíduo de abacaxi

Após a seleção do melhor agente extrator dentre os DESs investigados nas extrações preliminares, uma otimização do método de extração sólido-líquido assistido por vórtex foi conduzida por meio da utilização de um delineamento composto central

(DCC), através do qual as variáveis independentes investigadas foram a massa de amostra (g), o tempo de extração (min), a adição de água ao solvente eutético (% m m⁻¹) e a temperatura de extração (°C). A variável resposta foi o rendimento da extração (mgEAG g_{amostra}⁻¹). Para todos os ensaios, o volume de solvente foi fixado em 3 mL. A **Tabela 6** apresenta os ensaios realizados e os níveis das variáveis independentes que foram investigadas.

Tabela 6 - Matriz de experimentos do Delineamento Composto Central (DCC) realizado.

Ensaio	Adição de H₂O (A, %)	Massa de Amostra (M, g)	tempo (t, min)	Temperatura (T, °C)
1	20 (-1)	0,30 (-1)	60 (-1)	50 (-1)
2	20 (-1)	0,30 (-1)	60 (-1)	80 (+1)
3	20 (-1)	0,30 (-1)	120 (+1)	50 (-1)
4	20 (-1)	0,30 (-1)	120 (+1)	80 (+1)
5	20 (-1)	0,60 (+1)	60 (-1)	50 (-1)
6	20 (-1)	0,60 (+1)	60 (-1)	80 (+1)
7	20 (-1)	0,60 (+1)	120 (+1)	50 (-1)
8	20 (-1)	0,60 (+1)	120 (+1)	80 (+1)
9	50 (+1)	0,30 (-1)	60 (-1)	50 (-1)
10	50 (+1)	0,30 (-1)	60 (-1)	80 (+1)
11	50 (+1)	0,30 (-1)	120 (+1)	50 (-1)
12	50 (+1)	0,30 (-1)	120 (+1)	80 (+1)
13	50 (+1)	0,60 (+1)	60 (-1)	50 (-1)
14	50 (+1)	0,60 (+1)	60 (-1)	80(+1)
15	50 (+1)	0,60 (+1)	120 (+1)	50 (-1)
16	50 (+1)	0,60 (+1)	120 (+1)	80 (+1)
17	5 (-2)	0,45 (0)	90 (0)	65 (0)
18	65 (+2)	0,45 (0)	90 (0)	65 (0)
19	35 (0)	0,15 (-2)	90 (0)	65 (0)
20	35 (0)	0,75 (+2)	90 (0)	65 (0)
21	35 (0)	0,45 (0)	30 (-2)	65 (0)
22	35 (0)	0,45 (0)	150 (+2)	65 (0)
23	35 (0)	0,45 (0)	90 (0)	35 (-2)
24	35 (0)	0,45 (0)	90 (0)	95 (+2)
25	35 (0)	0,45 (0)	90 (0)	65 (0)
26	35 (0)	0,45 (0)	90 (0)	65 (0)
27	35 (0)	0,45 (0)	90 (0)	65 (0)

4.8. Análise estatística dos Dados

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada através do Teste de Tukey com 95% de confiança. Esta avaliação se deu com o auxílio do software Excel da Microsoft[®]. Para o delineamento composto central, a análise dos resultados se deu com auxílio do software Statistica[®] (versão 10), também a um nível de confiança de 95%.

A **Figura 20** ilustra as principais etapas realizadas para o desenvolvimento do método de extração aqui investigado.

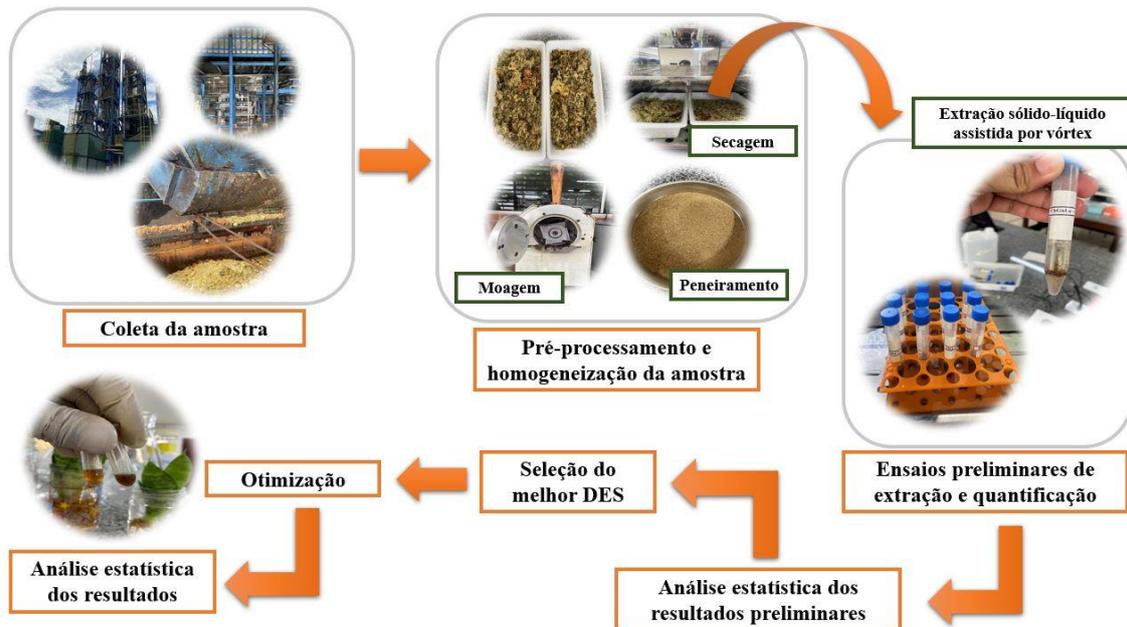


Figura 20 - Principais etapas realizadas na elaboração do método de extração sólido-líquido e quantificação de compostos fenólicos presentes no resíduo de abacaxi. **Fonte:** Autor.

4.9. Resultados e Discussão

4.9.1. Caracterização preliminar da amostra de resíduo de abacaxi

A análise preliminar da amostra do resíduo (após sua secagem, moagem e peneiramento) mostrou que o material possui uma elevada capacidade acidificante já que seu extrato lixiviado, a partir de uma solução 1:10 (m v⁻¹), apresentou um valor de pH de $3,32 \pm 0,02$. Como demonstrado no capítulo anterior, meios aquosos com altas concentrações de íons H₃O⁺ (baixos valores de pH) tendem a inibir a germinação de vegetais, além de comprometer a proliferação da microbiota nativa fundamental ao equilíbrio de certos biomas. A mitigação do potencial hidrogeniônico do meio aquoso pode ser atribuída à lixiviação de ácidos orgânicos, como ácido cítrico e alguns fenólicos livres, presentes na superfície do material.

Com relação à determinação do teor de açúcares redutores totais livres (ARTL), a quantificação foi realizada através da curva analítica previamente construída. Deste modo, verificou-se que o material apresentou um valor de $200,26 \pm 11,89 \text{ mg g}^{-1}_{\text{amostra}}$. Estes resultados caracterizam esse material lignocelulósico como potencialmente poluidor, uma vez que, o alto teor de carboidratos remanescentes no material, mesmo

após seu completo processamento industrial, indica não só uma falha no processamento industrial da matéria prima originária, como também representa um outro agravante do ponto de vista ambiental, uma vez que muito oxigênio é demandado para decompor todo este conteúdo orgânico, o que eleva os possíveis impactos ambientais advindos do descarte inadequado desta biomassa.

É importante salientar que, na indústria onde a coleta da amostra foi feita, não há um procedimento operacional para o descarte ou aproveitamento deste coproduto, sendo então compreendido como um resíduo que possui como único destino, o aterro sanitário. Desta forma, investigar métodos de extração e quantificação de bioativos presentes nestes materiais configura-se como uma forma de não só prover um novo destino, mas também de agregar valor à sua própria cadeia produtiva.

4.9.2. Extrações e quantificações preliminares

A **Figura 21** apresenta os resultados das extrações preliminares realizadas. Como é possível observar, os DESs apresentaram uma capacidade extratora estatisticamente diferente da apresentada pela clássica mistura aquosa etanol-água ($p < 0,05$).

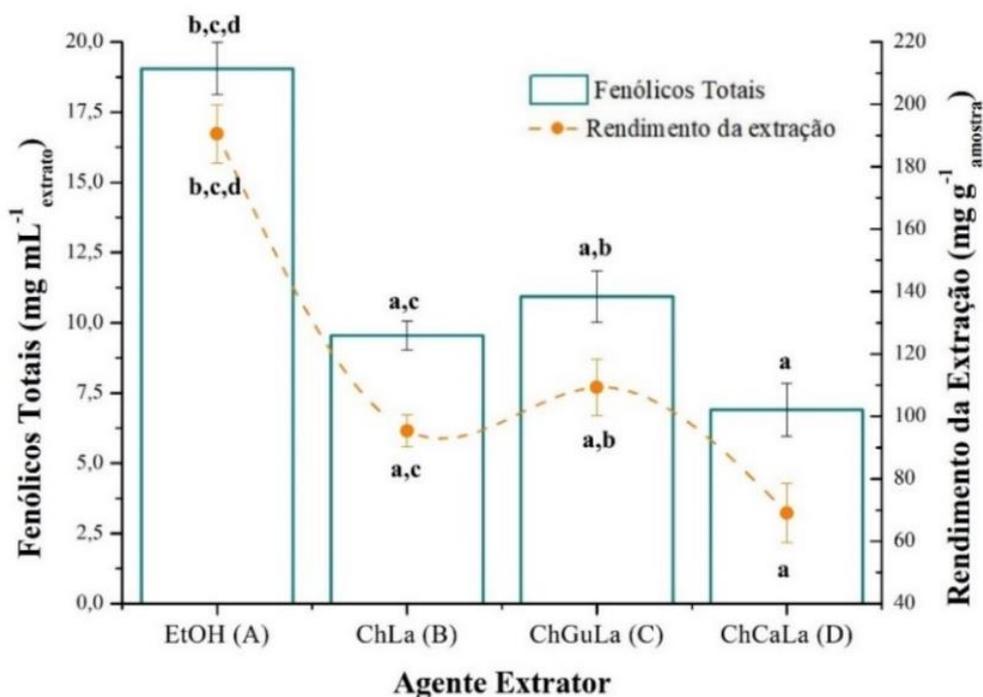


Figura 21 - Resultados da quantificação do teor de fenólicos totais presentes nos extratos obtidos nas condições preliminares. **Nota:** Diferentes letras (a,b,c e d) indicam diferentes valores ($p < 0,05$).

Dentre os DESs investigados, o melhor desempenho na extração dos bioanalitos alvos foi apresentado pelo ChGuLa, adicionado de 10% de água ($m\ m^{-1}$), sendo obtido um extrato que apresentou um teor de compostos fenólicos de $10,93 \pm 0,91\ mgEAG\ mL^{-1}_{extrato}$ ($109,30 \pm 9,06\ mgEAG\ g^1_{amostra}$).

O resultado acima reportado é cerca de 40% inferior ao obtido quanto a mistura EtOH (70% v v⁻¹) foi empregada, haja vista que o teor de polifenóis encontrado no extrato obtido foi equivalente a $19,05 \pm 0,94\ mgEAG\ mL^{-1}_{extrato}$ ($190,53 \pm 9,37\ mgEAG\ g^1_{amostra}$). Sendo o menor resultado, $6,90 \pm 0,94\ mgEAG\ mL^{-1}_{extrato}$ ($69,03 \pm 9,42\ mgEAG\ g^1_{amostra}$), aquele obtido quando o solvente ChCaLa, adicionado de 10 % de H₂O ($m\ m^{-1}$), foi empregado.

O melhor desempenho extrativo da solução hidroetanólica, frente aos demais solventes investigados, pode ser atribuído ao fato de o etanol, mesmo em sua forma pura, apresentar uma baixa viscosidade (1,17 cP, a 25 °C e 1 atm). Todos os DESs empregados como solventes nos ensaios preliminares, mesmo após a dição de 10% em massa de água, apresentam um valor de viscosidade superior, sendo estes: ChLa ($14,82 \pm 3,66\ cP$); ChGuLa ($208,04 \pm 1,95\ cP$) e ChCaLa ($91,58 \pm 17,22\ cP$), conforme reportado no capítulo anterior.

A constatação acima colocada tem respaldo no fato de altas viscosidades levarem ao espessamento da camada limite de transferência de matéria entre a fase sólida (amostra) e a fase fluida (solvente), o que promove uma diminuição da difusividade do analito [125–129].

Do ponto de vista prático, foi possível notar a melhor formação de vórtex quando o EtOH foi utilizado do que para qualquer um dos DESs, o que implica em uma melhor homogeneização do sistema sólido-líquido bem como um melhor contato entre as fases. Além disso, o efeito da viscosidade sobre a capacidade extratora de DESs já é algo plenamente estabelecido na literatura, o que valida as observações aqui pontuadas.

A melhor capacidade extratora apresentada pelo solvente ChGuLa pode ser justificada pelo fato deste apresentar, na estrutura de seus HBD precursores (glicose e ácido láctico), um maior número de sítios formadores de ligações de hidrogênio, o que aumenta sua capacidade de estabelecimento interações com os grupos funcionais polares presentes nos analitos de interesse [83].

Embora o outro DESs ternário, ChCaLa, também tenha um número de sítios de interação superior ao ChLa, por exemplo, a presença combinada de dois ácidos

orgânicos (ácido cítrico ($pK_{a1} = 3,14$) e ácido láctico ($pK_a = 3,86$)) pode ter contribuído para seu resultado numericamente inferior.

A última constatação acima feita está de acordo com o reportado por Mokrani e Madani (2016) [130], os quais, ao investigarem a extração de compostos fenólicos a partir de amostras de pera (*Prunus persica L.*), concluíram que a maior concentração dos bioativos recuperados ($336 \text{ mgEAG } 100\text{g}^{-1}$) foi alcançada na ausência do uso de ácido clorídrico (HCl) como agente acidificante do solvente extrator, acetona.

Conforme explicam os autores acima citados, embora o aumento na acidificação do meio promova um certo melhoramento na extração dos compostos fenólicos, sobretudo devido ao mecanismo hidrolítico que os libera da macroestrutura polimérica onde encontram-se covalentemente ligados, um excesso pode ser suficiente para promover a hidrólise parcial ou até a completa degradação de algumas classes destes compostos, como a das antocianinas, por exemplo.

Ao estudar a extração de compostos fenólicos a partir de amostras do coproduto oriundo do processamento do abacaxi, tal qual a amostra estudada na presente tese, Zampar et al. (2022) [131] concluíram que a melhor condição de extração, expressa em termos da concentração de compostos fenólicos totais ($405,06 \text{ mgEAG } 100\text{g}^{-1}$) foi obtida utilizando-se uma mistura binária de etanol (0,5) e solução ácida (0,5) de HCl (1 mol L^{-1}) e um método, assistido por ultrassom, conduzido a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, 50 W de potência ultrassônica durante 30 min. Os autores ainda destacaram que este resultado foi mais satisfatório do que quando uma concentração superior de ácido (2 mol L^{-1}) foi empregada, o que pode ser explicado através da mesma justificativa pontuada no parágrafo anterior.

Aliada à quantificação dos analitos presentes nos extratos obtidos (fase líquida), a caracterização da matriz amostral (fase sólida) também foi realizada, sendo os dados reportados na seção a seguir.

4.9.3. Caracterização das amostras sólidas antes e após as extrações preliminares.

Como forma de compreender ainda mais como cada agente extrator desempenhou seu papel na extração dos compostos fenólicos presentes na matriz amostral de estudo, realizou-se a caracterização desta antes e depois de ser submetida a cada uma das condições extrativas apresentadas na seção anterior.

A primeira avaliação realizada se deu por meio da determinação do percentual de lignina presente em cada fração sólida, uma vez que a maior parte dos compostos fenólicos se encontram covalentemente ligados uns aos outros formando este biopolímero estrutural.

Os dados para a quantificação dos teores de lignina (**Figura 22**) mostram que o material antes de qualquer tratamento (amostra não tratada) apresentava um teor de lignina equivalente a $9,39 \pm 0,52\%$ da massa total da amostra. Após a extração com a solução de etanol a $70\% v v^{-1}$ (EtOH), o material apresentou um percentual para o biopolímero em questão de cerca de $5,57 \pm 0,38\%$, o que equivaleu a uma remoção de cerca de $40,65 \pm 4,06\%$ em relação ao conteúdo presente na matriz pré-extração.

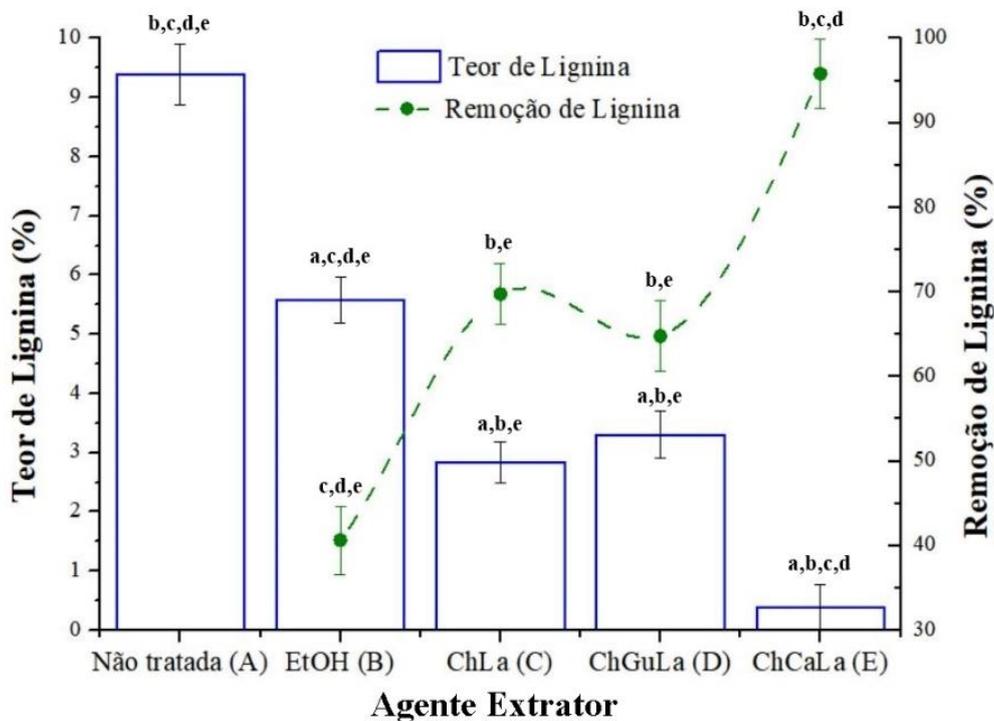


Figura 22 - Resultados da quantificação do teor e da remoção de lignina nas amostras de resíduo de abacaxi antes e após os ensaios preliminares de extração. **Nota:** Diferentes letras (a,b,c,d e e) indicam diferentes valores ($p < 0,05$).

A capacidade de remoção e fragmentação de soluções hidroetanólicas já é conhecida e bem fundamentada na literatura. Em seu estudo, por exemplo, Ji et al. (2021) [132] mostram que o uso combinado de um método, assistido por ultrassom, de deslignificação utilizando uma solução de etanol e água, e um DES ácido à base de cloreto de colina, glicerol e $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, foi capaz de promover uma remoção do biopolímero alvo equivalente a 83,39%, a partir de amostras de bagaço de cana-de-açúcar.

Outro estudo que corrobora com a premissa aqui reportada foi o realizado por Parchami, Agnihotri e Taherzadeh (2022) [133], no qual, os autores reportaram que foi obtida uma fração de lignina de alto grau de pureza (95%), a partir de amostras de grãos residuais da indústria cervejeira, foi alcançada ao utilizar-se uma solução etanol-água a 50% v v⁻¹, sendo o método extrativo conduzido a 180 °C durante 120 min.

Todavia, embora a remoção de lignina promovida pela solução EtOH tenha sido bastante considerável, esta não foi estatisticamente superior ($p < 0,05$) a nenhuma das remoções promovidas pela ação extrativa dos três DESs investigados na presente pesquisa.

A excelente capacidade de dissolução de lignina apresentada pelos DESs, sobretudo os de caráter ácido, já é uma notória realidade conhecida na literatura especializada. Um exemplo disso pode ser encontrado no trabalho apresentado por Guo et al. (2022) [134], onde um processo extrativo de biorrefino de amostras de bambu foi desenvolvido em condições não extremas (120 °C durante 2 h) por meio do uso de uma nova classe de DESs à base de cloreto e brometo de tetrametilamônio e ácido lático, tendo os ensaios conduzidos por estes apresentado uma excelente faixa de deslignificação (71,24-86,57%).

O estudo conduzido por Tan, Ngoh e Chua (2019) [135], por sua vez, reforçam a dependência da capacidade extratora dos DESs para com a natureza química dos precursores empregados, sobretudo como HBDs. Em sua avaliação realizada por meio da avaliação da capacidade deslignificante de vários sistemas eutéticos obtidos a partir de vários ácidos carboxílicos como HBDs, estes mostraram que quanto maior o número de grupos hidroxila (-OH) presentes nestes, bem como a presença de menores cadeias alquilas, levam a uma maior ação extrativa, destacando que os DESs à base de cloreto de colina e ácido lático (1:15 mol mol⁻¹) e cloreto de colina e ácido fórmico (1:2 mol mol⁻¹) apresentaram uma remoção superior a 60%, sendo a reatividade da lignina obtida muito similar à de origem comercial.

No entanto, é importante salientar que a ação dos solventes eutéticos profundos binários é limitada, sobretudo por questões aqui já reportadas, tais como o número de grupos funcionais disponíveis para interação direta com os analitos alvos da extração. Neste contexto, uma alternativa, que vem crescendo nos últimos anos, é o uso dos sistemas eutéticos ternários.

Uma ilustração do que foi acima dito pode ser feita por meio dos resultados reportados por Oh et al. (2020) [135], onde mais de vinte sistemas eutéticos foram avaliados quanto à sua capacidade de atuação como agentes extratores de lignina a partir de amostra de pó de pinho. No referido estudo, entre os sistemas binários e ternários investigados, o que apresentou melhor resposta extrativa foi o DES à base de cloreto de colina, ácido láctico e ácido fórmico (razão molar de 1:1:1), sendo esta constatação atribuída ao aumento da polaridade e da acidez devidos às propriedades individuais dos HBDs.

A discussão acima destacada está em total acordo com os dados obtidos no presente estudo uma vez que, o solvente ChLa, por exemplo, reduziu o teor de lignina do material em $69,76 \pm 3,63\%$ (teor final equivalente a $2,84 \pm 0,34\%$), sendo estatisticamente equivalente ($p > 0,05$) à redução promovida pelo ChGuLa, a qual foi equivalente a $64,79 \pm 4,21\%$ (teor final equivalente a $3,31 \pm 0,40\%$). No entanto, a maior remoção de lignina ($95,81 \pm 4,05\%$) foi promovida pelo solvente ChCaLa, uma vez que, após a extração realizada, a matriz amostral apresentou um teor de lignina equivalente a $0,39 \pm 0,38\%$ ($p < 0,05$).

Os dados acima apresentados, em conjunto com os da seção 4.5.1 apontam então para um empasse que finda no objetivo do processo extrativo que venha a ser desenvolvido. Como é possível notar, a maior presença de HBDs de caráter ácido, potencializa a remoção da lignina como um todo, no entanto, compromete a integridade dos compostos fenólicos liberados durante a extração. Como o foco do presente estudo é centrado na extração e quantificação dos monômeros bioativos, e não na extração do biopolímero, o melhor solvente dentre os avaliados é o ChGuLa, já que houve uma maior preservação da integridade dos compostos fenólicos extraídos (**Figura 21**).

A avaliação das modificações estruturais ocasionadas pelas extrações realizadas nos ensaios preliminares foi observada através dos espectros de infravermelho FTIR [136,137].

Como é possível observar nos espectros reportados na **Figura 23** uma banda muito acentuada é observada nos espectros na região espectral em torno de $3400-3200\text{ cm}^{-1}$, a qual é associada ao estiramento do grupo hidroxila (-OH) participante das ligações intra e intermoleculares presentes na estruturação das amostras lignocelulósicas. A mitigação do sinal nesta região, observada entre a amostra não tratada e amostra tratada com o solvente EtOH pode ser atribuída à remoção de constituintes lignocelulósicos

promovida pela ação deste. No entanto, para o caso das amostras tratadas com os DESs apresentaram um aumento nesta banda específica, o que pode ser explicado por uma possível fragmentação dos polímeros estruturais, deixando assim seus grupos -OH mais livres para vibrarem mediante a interação com a radiação eletromagnética na região do infravermelho.

A menor intensidade de banda, ainda na presente região, para a amostra tratada pelo solvente ChGuLa pode ser atribuída a sua menor ação hidrolítica e degenerativa, frente ao ChLa e ChGula, o que provavelmente levou a uma menor exposição dos fragmentos dos polímeros estruturais.

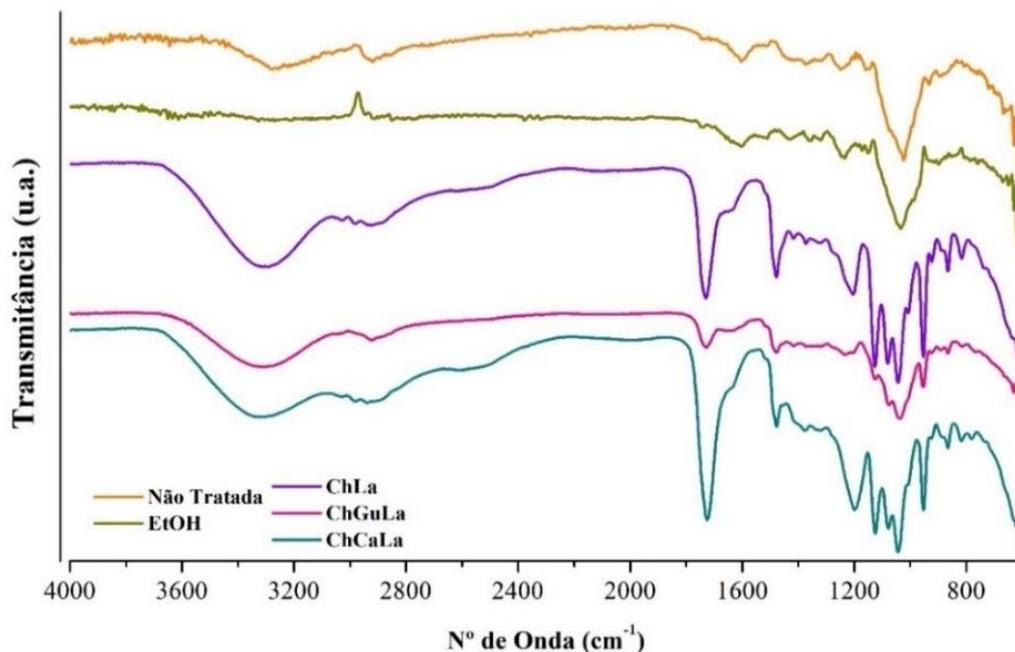


Figura 23 - Caracterização estrutural das amostras de resíduo do abacaxi por FTIR.

A capacidade hidrolítica está diretamente atrelada ao caráter ácido do solvente eutético, como já foi aqui anteriormente discutido. No entanto, é importante salientar que o DES ChGuLa (razão molar 5:2:1), embora apresente ácido láctico como um dos seus precursores, tem como HDB majoritário a glicose, o que o torna menos agressivo em relação aos demais.

As discretas bandas observadas entre 3000-2800 cm⁻¹ podem ser atribuídas a grupos metilênicos alifáticos ligados às cadeias polissacarídeas (celulose e hemicelulose) da estrutura das amostras. Já as bandas observadas em cerca de 1600 cm⁻¹ podem ser atribuídas ao estiramento de grupos C=C, C=O e/ou C-O-C associados à estrutura da lignina presente em cada material.

Por fim, as bandas observadas entre cerca de 1800-1600 cm^{-1} podem ser relacionadas com o estiramento vibracional de grupos C=O pertencentes à ácidos carboxílicos. Este último grupo, por sua vez, pode estar presentes em ácidos orgânicos oriundos da própria composição da matriz amostral ou podem ter sido intensificados, no caso das amostras tratadas com os DESs, devido a resíduos dos solventes extratores que permaneceram mesmo após a separação da fase líquida e lavagem da fração sólida ao término da extração.

A última constatação acima destacada pode ser confirmada ao notar-se que os espectros das amostras oriundas das extrações realizadas com os solventes ChLa e ChCaLa apresentaram uma banda muito mais acentuada na região associada ao grupo carboxílico do que aquela visualizada no espectro da amostra tratada com o ChGuLa. Como os primeiros solventes mencionados apresentam uma maior proporção de ácidos carboxílicos em suas estruturas, espera-se que estes também deixem mais resíduos desta natureza.

Por fim, a última caracterização da estrutura das amostras alvos deste presente estudo foi a análise da morfologia da sua superfície por meio da técnica de microscopia de varredura eletrônica (MEV), cujos resultados estão mostrados na **Figura 24**.

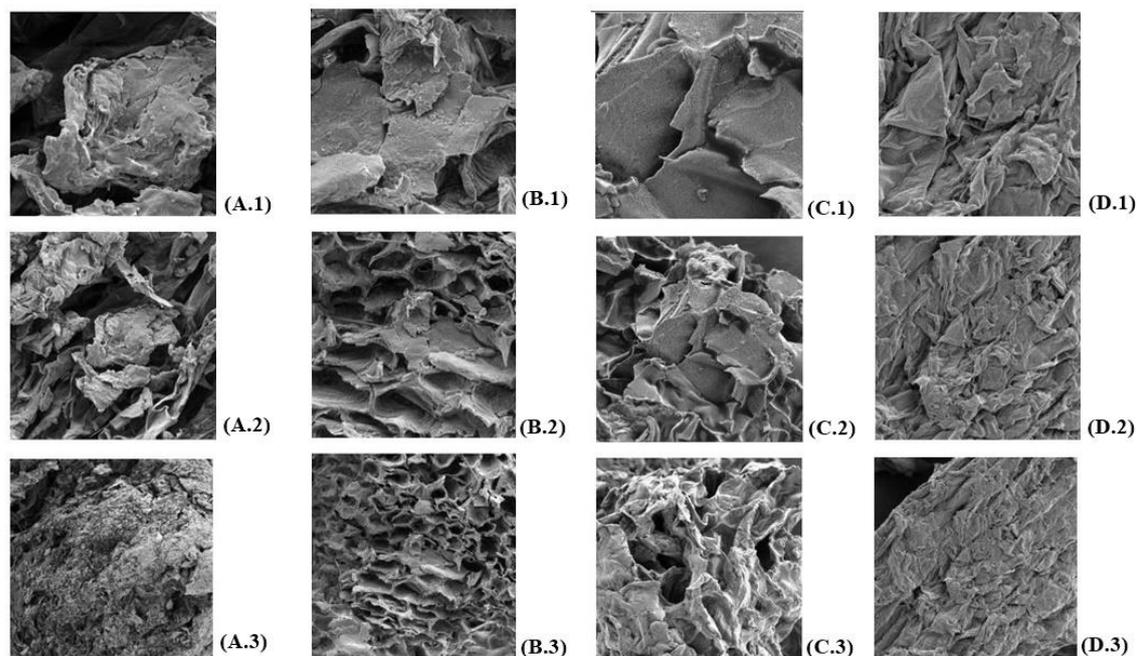


Figura 24 - Micrografias de varredura eletrônica para as amostras não tratadas (A) e após as extrações com EtOH (B), ChGuLa (C) e ChLa (D). **Nota:** Os índices 1,2 e 3 denotam as ampliações de 2500x, 1000x e 5130x, respectivamente.

Como é possível de observar nas micrografias da amostra não tratada (**Figura 24 (A)**), o material apresenta uma superfície bastante irregular e com um leve grau de porosidade, o que pode ser atribuído às diferentes características conferidas pelos polímeros amorfos (hemicelulose e lignina) e cristalinos (celulose) que o compõem majoritariamente. Esses resultados estão de acordo com os encontrados como também por Guancha-Chalapud, Serna-Cock e Tirado (2022) [138] para amostras sólidas análogas às aqui investigadas.

Após o tratamento com a solução hidroetanólica (EtOH) é observado um aumento na porosidade da superfície da amostra (**Figura 24 (B)**), resultado sobretudo da remoção das frações de ligninas que foram acessadas pelo solvente. Ao passo que o processo extrativo com o DES ChGuLa (**Figura 24 (C)**), um aumento na rugosidade do material também foi notório, o que pode ser atribuído ao maior grau de deslignificação apresentado por este frente ao observado quando o solvente EtOH foi empregado.

Por fim, o método extrativo conduzido com o DES ChLa (**Figura 24 (D)**) levou à formação de uma superfície mais amorfa e rugosa, sobretudo menos estruturada que as demais apresentadas. Tão desorganização pode ser explicada pela já aqui discutida capacidade fragmentadora do ácido láctico, o qual rompe boa parte das ligações covalentes que mantêm as unidades estruturantes da matriz amostral unidas. Para o caso da extração realizada por meio do solvente ChCaLa, o seu alto poder de deslignificação (**Figura 22**) levou à remoção total do polímero responsável pela firmeza de qualquer biomassa, a lignina, o que fez com que sua análise pela técnica de microscopia de varredura eletrônica fosse inviável devido à não sustentação da amostra no suporte empregado para introduzi-la no equipamento.

Todas as modificações observadas são resultadas da ação individual de cada solventes sobre a superfície da matriz, tão como foi aqui discutido, sendo essa uma constatação reportada em vários trabalhos que investigaram diferentes processos de beneficiamento de biomassas lignocelulósicas [136–139].

Baseando-se nos resultados reortados na presente seção, selecionou-se então o solvente ChGuLa como agente extrator alvo do estudo de otimização apresentado na seção a seguir.

4.9.4. Estudo da otimização da extração, seguida da quantificação, dos compostos fenólicos presentes na matriz amostral utilizando-se o DES ternário ChGuLa como agente extrator

Após a seleção do DES ChGuLa como potencial agente extrator de compostos fenólicos presentes na matriz amostral do resíduo do abacaxi, optou-se por realizar uma otimização estatística para encontrar-se a melhor condição de uso, tendo como a resposta o aumento na quantidade de compostos fenólicos recuperados. Deste modo, optou-se pela elaboração de um delineamento composto central (DCC), no qual, as variáveis independentes investigadas foram a adição de água ao sistema eutético (A, % m m⁻¹), a massa de amostra utilizada (M, g), o tempo de extração (t, min) e a temperatura de extração (T, °C). Os níveis investigados e a organização do conjunto de experimentos estão representados na **Tabela 9**.

Ao todo, foram realizados 27 ensaios de extrações, sendo dezesseis associados à porção fatorial do delineamento (ensaios de 1 a 16), oito aos pontos axiais (ensaios de 17 a 24) e três às repetições do ponto central (ensaios de 25 a 27).

A análise estatística da quantidade de compostos fenólicos totais (mgEAG g⁻¹_{amostra}) extraídos em cada ensaio revelou que, para os níveis verificados no delineamento realizado, a única variável que de fato exerceu uma influência preponderante sobre o processo extrativo ($p < 0,05$) foi a quantidade inicial de amostra utilizada. Conforme é possível observar no gráfico de Pareto representado na **Figura 25**.

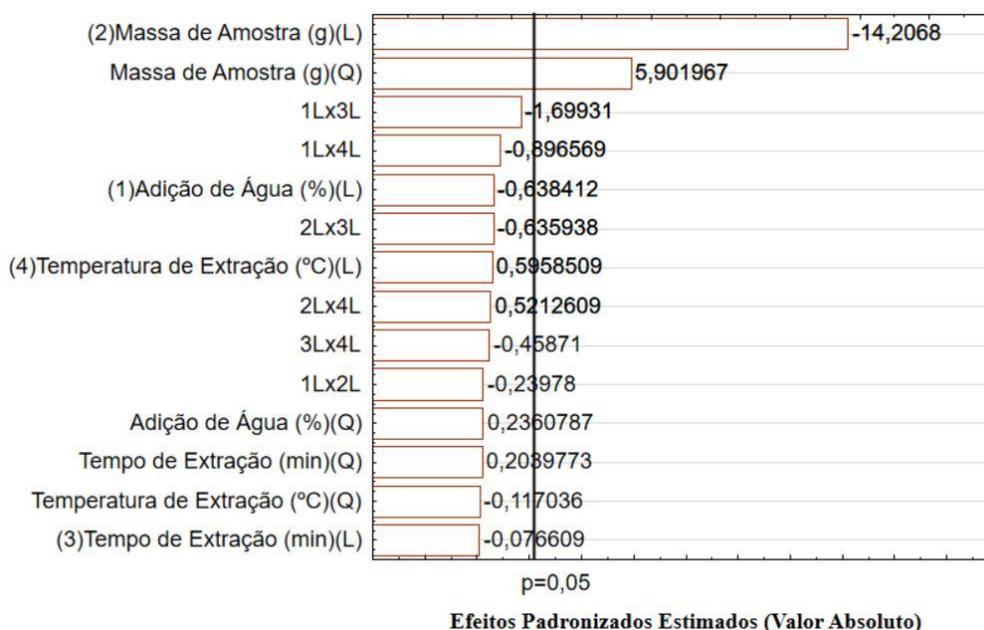


Figura 25 - Gráfico de Pareto para a análise estatística dos dados do Delineamento Composto Central (DCC) realizado.

Tabela 7 - Matriz de experimentos e resultados obtidos para o delineamento composto central (DCC).

Ensaio	Adição de H₂O (A, %)	Massa de Amostra (M, g)	tempo (t, min)	Temperatura (T, °C)	Fenólicos Totais (Observado) (mgEAG g_{amostra}⁻¹)	Fenólicos Totais (Predito) (mgEAG g_{amostra}⁻¹)	RSD (%)
1	20 (-1)	0,30 (-1)	60 (-1)	50 (-1)	113,18 ± 2,99	128,03	8,70
2	20 (-1)	0,30 (-1)	60 (-1)	80 (+1)	130,10 ± 3,11	128,03	1,13
3	20 (-1)	0,30 (-1)	120 (+1)	50 (-1)	137,56 ± 0,86	138,17	0,31
4	20 (-1)	0,30 (-1)	120 (+1)	80 (+1)	150,00 ± 1,72	138,17	5,81
5	20 (-1)	0,60 (+1)	60 (-1)	50 (-1)	69,53 ± 3,76	68,97	0,57
6	20 (-1)	0,60 (+1)	60 (-1)	80 (+1)	76,24 ± 3,45	68,97	7,08
7	20 (-1)	0,60 (+1)	120 (+1)	50 (-1)	73,51 ± 3,88	58,83	15,68
8	20 (-1)	0,60 (+1)	120 (+1)	80 (+1)	74,25 ± 0,75	58,83	16,39
9	50 (+1)	0,30 (-1)	60 (-1)	50 (-1)	137,06 ± 0,86	128,03	4,82
10	50 (+1)	0,30 (-1)	60 (-1)	80 (+1)	131,59 ± 4,56	128,03	1,94
11	50 (+1)	0,30 (-1)	120 (+1)	50 (-1)	133,08 ± 5,24	138,17	2,65
12	50 (+1)	0,30 (-1)	120 (+1)	80 (+1)	112,19 ± 3,95	138,17	14,68
13	50 (+1)	0,60 (+1)	60 (-1)	50 (-1)	65,05 ± 0,43	68,97	4,14
14	50 (+1)	0,60 (+1)	60 (-1)	80(+1)	73,26 ± 1,14	68,97	4,27
15	50 (+1)	0,60 (+1)	120 (+1)	50 (-1)	57,34 ± 1,14	58,83	1,82
16	50 (+1)	0,60 (+1)	120 (+1)	80 (+1)	69,53 ± 0,75	58,83	11,78
17	5 (-2)	0,45 (0)	90 (0)	65 (0)	79,77 ± 0,57	83,42	3,17
18	65 (+2)	0,45 (0)	90 (0)	65 (0)	83,75 ± 1,00	83,42	0,28
19	35 (0)	0,15 (-2)	90 (0)	65 (0)	226,37 ± 4,56	212,94	4,32
20	35 (0)	0,75 (+2)	90 (0)	65 (0)	54,23 ± 0,36	74,54	22,31
21	35 (0)	0,45 (0)	30 (-2)	65 (0)	85,41 ± 2,27	83,42	1,66
22	35 (0)	0,45 (0)	150 (+2)	65 (0)	77,45 ± 1,00	83,42	5,25
23	35 (0)	0,45 (0)	90 (0)	35 (-2)	77,11 ± 0,60	83,42	5,55
24	35 (0)	0,45 (0)	90 (0)	95 (+2)	79,10 ± 0,99	83,42	3,76
25	35 (0)	0,45 (0)	90 (0)	65 (0)	89,05 ± 2,30	83,42	4,62
26	35 (0)	0,45 (0)	90 (0)	65 (0)	76,78 ± 9,02	83,42	5,86
27	35 (0)	0,45 (0)	90 (0)	65 (0)	81,76 ± 3,99	83,42	1,42

Em termos práticos, é possível atribuir este fato à forte dependência dos processos extrativos para com a necessidade de um ótimo contato entre as fases envolvidas. Experimentalmente falando, foi possível observar que em ensaios onde uma maior quantidade de amostra foi utilizada, maior era a dificuldade de homogeneização do sistema, dada a ineficiência do sistema em formar vórtex, o que propicia uma menor interação entre o solvente extrator e a matriz amostral.

No estudo realizado por Liu et al. (2022) [140] foi observado, por meio de uma otimização quimiométrica da extração de ácidos fenólicos e flavonoides a partir de amostras de flores hibisco (*Hibiscus monihot L.*) utilizando solventes eutéticos à base de álcoois, que o aumento na razão solvente-sólido (amostra), apresentou um significativo efeito na capacidade extratora do sistema eutético em questão. Os autores constataram que o aumento desta variável independente levava a uma melhor extração dos compostos alvos, todavia, entre uma faixa superior a 26 mL g⁻¹, ocorria um decréscimo na concentração dos ativos recuperados na fase do solvente.

Por sua vez, Liu et al. (2019) [141] demonstraram que a razão entre o volume de DES e quantidade de amostra de fato desempenham um papel chave no desenvolvimento de um método extrativo onde o alvo é a extração de biomoléculas presentes em matrizes vegetais. Ao investigarem a ação extratora de NADESs à base de ácidos orgânicos e açúcares, os autores constaram que uma razão sólido-líquido de 0.1/10 g mL⁻¹ fora suficiente para que, em conjunto com as demais condições ótimas de extração (50 °C e 30 min), o melhor rendimento extrativo de curcuminoides fosse atingido.

Ao estudar a extração assistida por micro-ondas e a quantificação de compostos fenólicos presentes em amostras de resíduos de abacaxi utilizando um DES à base de cloreto de colina e glicerol, Vargas-Sena, Ochoa-Martínez e Vélez-Pasos (2022) [106] verificaram que a melhor condição extratora se dava justamente quando a razão solvente-massa de amostra era equivalente a 60,5 mL g⁻¹.

De porte dos resultados acima colocados, fica notório que cada sistema eutéticos irá atuar em uma faixa diferente de condições ótimas, o que está correlacionado com os diferentes mecanismos de interação apresentados pelos diversos DESs possíveis de serem aplicados nesse contexto. Em todos os ensaios preliminares da presente pesquisa, a razão solvente-amostra utilizada foi de 10/1 mL g⁻¹, variando para mais e para menos no delineamento experimental conduzido, mediante o aumento e diminuição na

quantidade de amostra utilizada. Um excesso de amostra, como já foi mencionado, dificulta a interação entre a fase fluida e a fase sólida por meio do péssimo contato possível entre ambas. Por sua vez, embora a diminuição na quantidade de amostra viabilize este percalço, uma quantidade muito ínfima de amostra pode levar a um gradiente de concentração muito pequeno, o que não favorece uma boa extração haja vista que este é a força motriz por trás dos fenômenos de transferência de matéria.

Os fatos supracitados explicam os diferentes efeitos promovidos pelas contribuições da quantidade de amostra para com o aumento da resposta investigada (**Figura 25**). Desta forma, para construção do modelo estatístico que descreve o método de extração aqui estudado (**Equação 2**), ambas as contribuições dadas pela quantidade de amostra (linear e quadrática) foram mantidas. Além disso, devido ao melhoramento do ajuste e aumento da capacidade explicativa do modelo, a interação entre a quantidade de amostra e o tempo de extração foi também mantida. As demais contribuições que não mostram efeitos significativos ($p > 0,05$) sobre a variável de resposta (extração de fenólicos totais) não foram consideradas para a construção do modelo representado a seguir:

$$\text{Extração de Fenólicos Totais (mg g}^{-1}\text{ amostra)} = 83,41 (\pm 1,60) - 34,60 (\pm 1,26) \times M + 15,08 (\pm 1,20) \times M^2 - 5,07 (\pm 1,54) \times M.t \quad (\text{Equação 2}).$$

Ainda sobre a interação entre a quantidade de massa de amostra e o tempo de extração, é importante destacar que seu efeito negativo sobre a extração dos analitos de interesse (**Equação 2**) pode ser atribuída ao fato de que, embora um aumento na quantidade de amostra leve a um incremento no gradiente de concentração, a exposição dos analitos extraídos à atmosfera relativamente ácida do solvente pode levá-los à sua degradação, o que diminui a concentração mensurada na etapa de quantificação. É também importante salientar que, embora não tenha se mostrado significativa para os níveis investigados ($p > 0,05$), a ação da temperatura não pode ser fisicamente descartada da discussão devido a seu efeito cinético nas reações de hidrólise e decomposição dos analitos, sobretudo em prolongados tempos de extração.

A **Tabela 10** apresenta a análise de variância (ANOVA) para o modelo elaborado (**Equação 2**), destacando-se então o ótimo coeficiente de correlação obtido ($R^2 =$

0,944), o qual informa que mais de 94% das variações observadas entre as predições do modelo e os dados medidos na prática podem por este serem explicadas.

Tabela 8 - ANOVA para o modelo de regressão obtido pelo Delineamento Composto Central (DCC) realizado.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Fcalc	Fcalc/Ftab
Regressão	35201,91	3	11733,97	129,41	42,738
Resíduo	2085,46	23	90,67	-	-
Falta de Ajuste	2009,27	21	95,68	2,51	0,129
Erro Puro	76,20	2	38,10	-	-
Total	37287,37	26	-	-	-

$R^2 = 0,944$; $F_{\text{tab}(0,95; 3,23)} = 3,03$; $F_{\text{tab}(0,95; 21,2)} = 19,45$.

Deste modo, e com base no exposto na **Tabela 10**, pode-se dizer que o modelo descrito pela **Equação 2**, além de estatisticamente significativo ($F_{\text{calc}}/F_{\text{tab}}$ para regressão > 1), também é preditivo ($F_{\text{calc}}/F_{\text{tab}}$ para falta de ajuste < 1).

Em suporte a estas informações, é importante destacar que os resíduos mensurados entre os rendimentos da extração observados e os preditos pelo modelo (**Figura 26**) seguem uma distribuição aleatória, o que indica que tanto a modelagem quanto as etapas empregadas em sua elaboração, sobretudo o método de quantificação das respostas, não estão de forma alguma tendenciando os resultados obtidos.

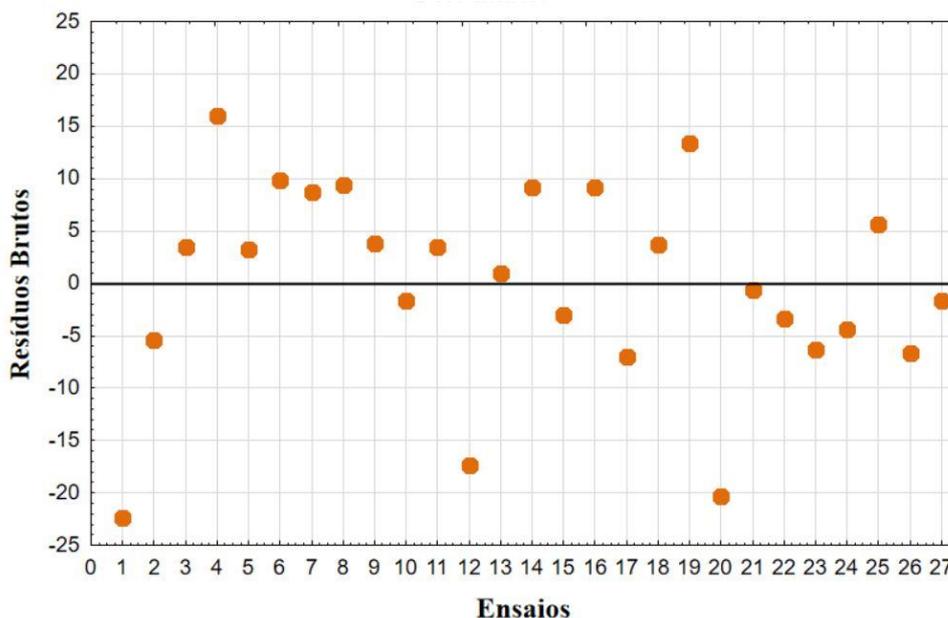


Figura 26 - Gráficos dos resíduos brutos versus os ensaios realizados de acordo com o Delineamento Composto Central (DCC).

Os valores dos desvios padrões residuais (*Residual Standard Deviation* – RSD), reportados na **Tabela 9**, variaram entre 0,28 e 22,30%. Os maiores valores (acima de 10%) estão associados aos ensaios (7,8, 12, 16 e 20), justamente nos quais as variáveis que compõem o modelo (**Equação 2**) assumem valores extremos, seja na porção fatorial (+1) ou axial (+2,) da matriz do delineamento (**Tabela 9**), ou seja, onde os cálculos dos valores preditos foram feitos nas extremidades da faixa de construção do modelo, região essa onde de fato a capacidade de predição não é tão efetiva, sendo a melhor sempre entre os limites.

A **Figura 27** apresenta a superfície de resposta (a) e o gráfico de contornos (b) oriundos da representação gráfica da dependência da variável dependente (rendimento da extração) em função das variáveis independente (massa de amostra e tempo de extração) reportadas no modelo (**Equação 2**).

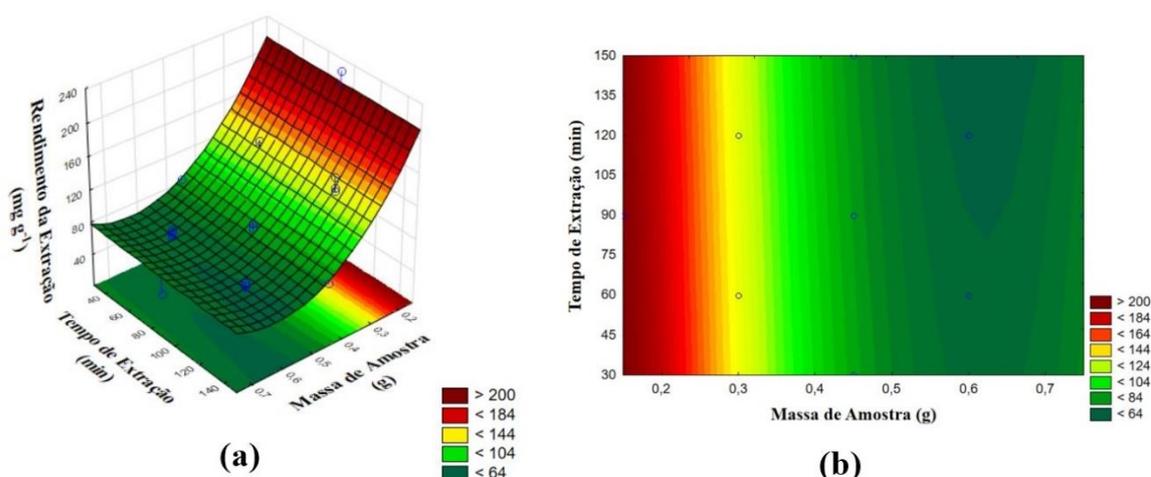


Figura 27 - Superfície de resposta (a) e gráfico de contornos (b) gerados a partir do modelo estatístico obtido.

Ambas as representações gráficas expostas na **Figura 27** mostram que para maiores quantidades de massa de amostra empregada no método de extração, um singelo incremento na resposta é observado quando tempos de extração intermediários são empregados. No entanto, é possível observar que as melhores respostas estão associadas ao uso de quantidades menores de amostras, o que está em completo acordo com a discussão que aqui vem sendo levantada.

Por meio da metodologia da superfície de resposta (RSM) foi então possível constatar que valores de massa de amostra abaixo de 0,2 g levam à uma maximização da capacidade extrativa do solvente ChGuLa, sobretudo devido à maior razão volume-

amostra observada. Sendo assim, dentre todos os ensaios realizados, selecionou-se o de número 19 como aquele que apresentou a melhor resposta dentre as observadas (**Tabela 9**).

O ensaio acima mencionado apresentou um rendimento de extração de compostos fenólicos totais equivalente a $226,37 \pm 4,56$ mgEAG g^{-1} amostra, o que equivale a uma contração de $11,32 \pm 0,23$ mgEAG mL^{-1} extrato. Este rendimento foi estatisticamente superior ($p < 0,05$) ao obtido por todos os ensaios preliminares, inclusive quando comparado à convencional solução hidroetanólica (EtOH).

A este ponto, é importante salientar que a substituição do etanol como agente extrator em processos de obtenção de compostos bioativos destinados ao uso por indivíduos é de suma relevância para os setores farmacêuticos e alimentícios pois é sabido que há muitas restrições para o uso pediátrico de extratos etanólicos bem como para o caso de sua administração para pessoas intolerantes a este solvente orgânico [122].

Ao observar-se as condições operacionais associadas à extração conduzida no ensaio 19, verifica-se que este foi realizado com uma adição de 35% m^{-1} de água ao DES ChGuLa e à uma temperatura de 65 °C durante 90 min, utilizando-se para tal 0,15 g de amostra e 3 mL de solvente (razão líquido-sólido de 20 $mL g^{-1}$ amostra)

De porte da informação acima posta, é importante destacar-se a contribuição da adição de água para o melhor desempenho observado, pois desta não decorre apenas seu efeito na mitigação da viscosidade do sistema eutético em questão, mas também na redução da sua tensão superficial. Conforme foi reportado no Capítulo 3, a adição de cerca de 30% de água ao DES ChGuLa promove uma brusca queda no valor medido para esta propriedade (cerca de 56% de redução), ficando esta inferior à da própria água (**Figura 16 (a)**). Sendo assim, reitera-se que é amplamente sabido que baixas viscosidades e tensões superficiais permitem uma maior interação entre as fases envolvidas numa extração heterogênea, levando assim a maiores taxas de transferência de matéria entre estas.

Além disso, salienta-se que o resultado obtido no melhor ensaio se encontra dentro do que vem sendo reportado por outros trabalhos realizados com a mesma matriz amostral aqui estudada. Um exemplo são os dados apresentados por Sepúlveda et al. (2018) [87], onde, através de uma extração realizada por uma reação de autohidrólise (utilizando água como solvente), a extração de 1,75 $g L^{-1}$ (cerca de 1,75 $mg mL^{-1}$ extrato)

de fenólicos totais foi obtida em um processo conduzido a 200 °C durante 30 min, tendo sido a razão solvente-amostra equivalente 10 mL g⁻¹_{amostra}.

No trabalho conduzido por Zampar et al. (2022) [131], também para análoga matriz amostral, os autores apontaram para uma mistura de 50:50 de etanol e solução aquosa de ácido clorídrico (1 mol L⁻¹) como a melhor dentre as investigadas para a extração da mesma classe de bioanalitos investigadas nesta tese. Em sua melhor condição operacional (60 °C, 50 W de potência ultrassônica e 30 min) a extração de compostos fenólicos totais foi equivalente a 405,06 mg 100g⁻¹_{extrato}. Destacando-se sobretudo o já conhecido caráter altamente ecotóxico da mistura empregada como agente extrator.

Por fim, em contraponto às tradicionais alternativas acima investigadas, o trabalho aqui também já comentado de Vargas-Senas et al. (2022) [106] destacou que a melhor concentração de compostos fenólicos extraídos (7,98 mg g⁻¹_{extrato}) foi obtida mediante a capacidade extratora do DES por eles utilizado a uma condição de extração de: 67 °C, 87 s e uma razão solvente-amostra de 60.5 mL g⁻¹_{extrato}.

Considerações Finais

Os dados obtidos no presente capítulo reiteram a grande versatilidade dos solventes eutéticos profundos em serem utilizados como agentes extratores em diferentes contextos. Por meio dos presentes resultados, é possível apontar o papel fundamental exercido pelos grupos funcionais presentes nas espécies empregadas como HBDs na extração dos analitos em questão.

Quanto maior o número de sítio formadores de ligações de hidrogênio disponíveis, maior é a capacidade de extração dos compostos de interesse, o que explica sobretudo a maior ação extrativa apresentada pelo DES ternário (ChGuLa) frente ao binário (ChLa). Outro aspecto relevante é a acidez dos constituintes que formam o sistema eutético, podendo esta comprometer a estabilidade dos compostos extraídos e assim os teores quantificados, como foi observado para o caso do ChCaLa.

Por fim, destaca-se que a razão solvente-massa de amostra se apresenta como uma variável chave na otimização do método de extração em questão, uma vez que sua diminuição, pelo aumento da quantidade de massa de amostra, pode levar uma mitigação do contato sólido-líquido, impedindo assim os fenômenos difusivos de transferência de matéria.

Conclusão

Os dados apresentados na presente tese de doutorado contribuem significativamente para a ainda recente literatura acerca do uso de solventes eutéticos profundos (DESS) em métodos de extração. A ponte estabelecida entre as propriedades físico-químicas, estruturais, ecotóxicas, fluidodinâmicas e extratores permite a obtenção de elucidações concisas e robustas para uma área de aplicação ainda deficiente de dados que elucidam sobre aspectos tão precisos.

A investigação sobre o uso dos DESS ternários na extração e quantificação de compostos fenólicos vem a acrescentar a esta área tão promissora, em especial devido à aplicação destes compostos na formulação de medicamentos e/ou nutracêuticos destinados ao melhoramento da qualidade de vida humana, em especial em contextos em que o fortalecimento da imunidade é tão importante tal qual o da última pandemia de COVID-19.

A quantificação dos teores de compostos fenólicos presentes na matriz amostral do resíduo do abacaxi contribuiu para a valorização deste material por meio da constatação da presença de compostos tão amplamente investigados devido às suas já conhecidas ações antioxidantes, anticâncer, antiviral e ativadora do sistema imunológico.

Como perspectivas para a continuidade desta pesquisa, destaca-se que a identificação do perfil de compostos fenólicos, bem como os ensaios de determinação de suas atividades biológicas, compõem um grupo de estudos que serão futuramente realizados com o intuito de aprofundar as discussões aqui levantadas.

Por fim, esta tese traça um paralelo entre a química analítica e o desenvolvimento de pesquisas aplicadas à solução de demandas emergentes da sociedade, tais como o reaproveitamento de resíduos agroindustriais e o desenvolvimento de processos otimizados que atendam sobretudo às demandas urgentes do meio ambiente.

REFERÊNCIAS

- [1] S. Armenta, S. Garrigues, F.A. Esteve-Turrillas, M. de la Guardia, Green extraction techniques in green analytical chemistry, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 116 (2019) 248–253. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.03.016>.
- [2] M. de la Guardia, S. Garrigues, Chapter 1. Past, Present and Future of Green Analytical Chemistry, in: 2020: pp. 1–18. <https://doi.org/10.1039/9781788016148-00001>.
- [3] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 50 (2013) 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>.
- [4] C.W. Huie, A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants, *Anal Bioanal Chem*. 373 (2002) 23–30. <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1265-3>.
- [5] S.C. Cunha, J.O. Fernandes, Extraction techniques with deep eutectic solvents, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 105 (2018) 225–239. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.05.001>.
- [6] W. A. Costa, L. F. B. L. Pontes, A. G. G. Pessoa, Use of Deep Eutectic Solvents in Sample Preparation, in: *Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications and Toxicity*, 1st ed., Nov. Sci. Pub, 2022.
- [7] F. J. Krug, F. R. P. Rocha, Métodos de Preparo de Amostras para Análise Elementar, 2nd ed., Soc. Bras. de Quim, 2019.
- [8] A.P. Abbott, D. Boothby, G. Capper, D.L. Davies, R.K. Rasheed, Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids, *J Am Chem Soc*. 126 (2004) 9142–9147. <https://doi.org/10.1021/ja048266j>.
- [9] C. Florindo, A.J.S. McIntosh, T. Welton, L.C. Branco, I.M. Marrucho, A closer look into deep eutectic solvents: exploring intermolecular interactions using solvatochromic probes, *Physical Chemistry Chemical Physics*. 20 (2018) 206–213. <https://doi.org/10.1039/C7CP06471C>.
- [10] E.L. Smith, A.P. Abbott, K.S. Ryder, Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications, *Chem Rev*. 114 (2014) 11060–11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>.
- [11] Y.P. Mbous, M. Hayyan, A. Hayyan, W.F. Wong, M.A. Hashim, C.Y. Looi, Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering—Promises and challenges, *Biotechnol Adv*. 35 (2017) 105–134. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.006>.
- [12] N. Altunay, A. Elik, R. Gürkan, Preparation and application of alcohol based deep eutectic solvents for extraction of curcumin in food samples prior to its

- spectrophotometric determination, *Food Chem.* 310 (2020) 125933. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125933>.
- [13] K. Radošević, M. Cvjetko Bubalo, V. Gaurina Srček, D. Grgas, T. Landeka Dragičević, I. Radojčić Redovniković, Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents, *Ecotoxicol Environ Saf.* 112 (2015) 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.034>.
- [14] Y.H. Choi, J. van Spronsen, Y. Dai, M. Verberne, F. Hollmann, I.W.C.E. Arends, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte, Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology?, *Plant Physiol.* 156 (2011) 1701–1705. <https://doi.org/10.1104/pp.111.178426>.
- [15] F.M. Perna, P. Vitale, V. Capriati, Deep eutectic solvents and their applications as green solvents, *Curr Opin Green Sustain Chem.* 21 (2020) 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.09.004>.
- [16] B.B. Hansen, S. Spittle, B. Chen, D. Poe, Y. Zhang, J.M. Klein, A. Horton, L. Adhikari, T. Zelovich, B.W. Doherty, B. Gurkan, E.J. Maginn, A. Ragauskas, M. Dadmun, T.A. Zawodzinski, G.A. Baker, M.E. Tuckerman, R.F. Savinell, J.R. Sangoro, Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications, *Chem Rev.* 121 (2021) 1232–1285. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00385>.
- [17] D.L. Vollmer, V.A. West, E.D. Lephart, Enhancing skin health: By oral administration of natural compounds and minerals with implications to the dermal microbiome, *Int J Mol Sci.* 19 (2018). <https://doi.org/10.3390/ijms19103059>.
- [18] M. Sharifi-Rad, C. Lankatillake, D.A. Dias, A.O. Docea, M.F. Mahomoodally, D. Lobine, P.L. Chazot, B. Kurt, T.B. Tumer, A.C. Moreira, F. Sharopov, M. Martorell, N. Martins, W.C. Cho, D. Calina, J. Sharifi-Rad, Impact of natural compounds on neurodegenerative disorders: From preclinical to pharmacotherapeutics, *J Clin Med.* 9 (2020). <https://doi.org/10.3390/jcm9041061>.
- [19] N. Mi ekus, K. Marszałek, M. Podlacha, A. Iqbal, C. Puchalski, A.H. Swiergiel, Health Benefits of Plant-Derived Sulfur Compounds, Glucosinolates, and Organosulfur Compounds, *Molecules.* 25 (2020). <https://doi.org/10.3390/molecules25173804>.
- [20] L. Panzella, Natural phenolic compounds for health, food and cosmetic applications, *Antioxidants.* 9 (2020). <https://doi.org/10.3390/antiox9050427>.
- [21] A. Wojdyło, P. Nowicka, Á.A. Carbonell-Barrachina, F. Hernández, Phenolic compounds, antioxidant and antidiabetic activity of different cultivars of *Ficus carica* L. fruits, *J Funct Foods.* 25 (2016) 421–432. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.06.015>.
- [22] I. Bhushan, M. Sharma, M. Mehta, S. Badyal, V. Sharma, I. Sharma, H. Singh, S. Sistla, Bioactive compounds and probiotics—a ray of hope in COVID-19

- management, *Food Science and Human Wellness*. 10 (2021) 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2021.02.001>.
- [23] P.R. Augusti, G.M.M. Conterato, C.C. Denardin, I.D. Prazeres, A.T. Serra, M.R. Bronze, T. Emanuelli, Bioactivity, bioavailability, and gut microbiota transformations of dietary phenolic compounds: implications for COVID-19, *Journal of Nutritional Biochemistry*. 97 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108787>.
- [24] M.F.A. El-Maati, S.A. Mahgoub, S.M. Labib, A.M.A. Al-Gaby, M.F. Ramadan, Phenolic extracts of clove (*Syzygium aromaticum*) with novel antioxidant and antibacterial activities, *Eur J Integr Med*. 8 (2016) 494–504. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2016.02.006>.
- [25] G.K. Ziyatdinova, H.C. Budnikov, Natural phenolic antioxidants in bioanalytical chemistry: state of the art and prospects of development, *Russian Chemical Reviews*. 84 (2015) 194–224. <https://doi.org/10.1070/rcr4436>.
- [26] A. Lakka, S. Grigorakis, I. Karageorgou, G. Batra, O. Kaltsa, E. Bozinou, S. Lalas, D.P. Makris, Saffron processing wastes as a bioresource of high-value added compounds: Development of a green extraction process for polyphenol recovery using a natural deep eutectic solvent, *Antioxidants*. 8 (2019). <https://doi.org/10.3390/antiox8120586>.
- [27] M. Ali Asgar, Anti-diabetic potential of phenolic compounds: A review, *Int J Food Prop*. 16 (2013) 91–103. <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.595864>.
- [28] L. Mamede, A. Ledoux, O. Jansen, M. Frédérich, Natural Phenolic Compounds and Derivatives as Potential Antimalarial Agents, *Planta Med*. 86 (2020) 585–618. <https://doi.org/10.1055/a-1148-9000>.
- [29] V. Loaiza-Cano, L.M. Monsalve-Escudero, C. da S.M.B. Filho, M. Martinez-Gutierrez, D.P. de Sousa, Antiviral role of phenolic compounds against dengue virus: A review, *Biomolecules*. 11 (2021) 1–28. <https://doi.org/10.3390/biom11010011>.
- [30] P.R. Augusti, G.M.M. Conterato, C.C. Denardin, I.D. Prazeres, A.T. Serra, M.R. Bronze, T. Emanuelli, Bioactivity, bioavailability, and gut microbiota transformations of dietary phenolic compounds: implications for COVID-19, *Journal of Nutritional Biochemistry*. 97 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108787>.
- [31] N. Gligorijevic, M. Radomirovic, O. Nedic, M. Stojadinovic, U. Khulal, D. Stanic-Vucinic, T.C. Velickovic, Molecular mechanisms of possible action of phenolic compounds in covid-19 protection and prevention, *Int J Mol Sci*. 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms222212385>.
- [32] A. Khalil, D. Tazeddinova, The upshot of Polyphenolic compounds on immunity amid COVID-19 pandemic and other emerging communicable diseases: An appraisal, *Nat Prod Bioprospect*. 10 (2020) 411–429. <https://doi.org/10.1007/s13659-020-00271-z>.

- [33] R. Davella, S. Gurrapu, E. Mamidala, Phenolic compounds as promising drug candidates against COVID-19 - An integrated molecular docking and dynamics simulation study, in: *Mater Today Proc*, Elsevier Ltd, 2021: pp. 522–527. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.05.595>.
- [34] P. Gullón, B. Gullón, A. Romaní, G. Rocchetti, J.M. Lorenzo, Smart advanced solvents for bioactive compounds recovery from agri-food by-products: A review, *Trends Food Sci Technol.* 101 (2020) 182–197. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.007>.
- [35] E. Cea-Klapp, N. Gajardo-Parra, P. Aravena, H. Quinteros-Lama, C. Held, R.I. Canales, J.M. Garrido, Interfacial Properties of Deep Eutectic Solvents by Density Gradient Theory, *Ind Eng Chem Res.* 61 (2022) 2580–2591. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.1c03817>.
- [36] M.K. Alomar, M. Hayyan, M.A. Alsaadi, S. Akib, A. Hayyan, M.A. Hashim, Glycerol-based deep eutectic solvents: Physical properties, *J Mol Liq.* 215 (2016) 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.11.032>.
- [37] A. Shishov, I. Dubrovsky, S. Kirichenko, A. Bulatov, Behavior of quaternary ammonium salts and terpenoids-based deep eutectic solvents in aqueous phase, *J Mol Liq.* 347 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117987>.
- [38] K. Radošević, I. Čanak, M. Panić, K. Markov, M.C. Bubalo, J. Frece, V.G. Srček, I.R. Redovniković, Antimicrobial, cytotoxic and antioxidative evaluation of natural deep eutectic solvents, *Environmental Science and Pollution Research.* 25 (2018) 14188–14196. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1669-z>.
- [39] C. Florindo, F. Lima, L.C. Branco, I.M. Marrucho, Hydrophobic Deep Eutectic Solvents: A Circular Approach to Purify Water Contaminated with Ciprofloxacin, *ACS Sustain Chem Eng.* 7 (2019) 14739–14746. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b02658>.
- [40] P. Makoś, E. Słupek, J. Gębicki, Hydrophobic deep eutectic solvents in microextraction techniques—A review, *Microchemical Journal.* 152 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104384>.
- [41] D.J.G.P. van Osch, C.H.J.T. Dietz, S.E.E. Warrag, M.C. Kroon, The Curious Case of Hydrophobic Deep Eutectic Solvents: A Story on the Discovery, Design, and Applications, *ACS Sustain Chem Eng.* 8 (2020) 10591–10612. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c00559>.
- [42] M. de los Á. Fernández, J. Boiteux, M. Espino, F.J.V. Gomez, M.F. Silva, Natural deep eutectic solvents-mediated extractions: The way forward for sustainable analytical developments, *Anal Chim Acta.* 1038 (2018) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.07.059>.
- [43] A.P.R. Santana, J.A. Mora-Vargas, T.G.S. Guimarães, C.D.B. Amaral, A. Oliveira, M.H. Gonzalez, Sustainable synthesis of natural deep eutectic solvents (NADES) by different methods, *J Mol Liq.* 293 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111452>.

- [44] F. Gabriele, M. Chiarini, R. Germani, M. Tiecco, N. Spreti, Effect of water addition on choline chloride/glycol deep eutectic solvents: Characterization of their structural and physicochemical properties, *J Mol Liq.* 291 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111301>.
- [45] I.P.E. Macário, F. Jesus, J.L. Pereira, S.P.M. Ventura, A.M.M. Gonçalves, J.A.P. Coutinho, F.J.M. Gonçalves, Unraveling the ecotoxicity of deep eutectic solvents using the mixture toxicity theory, *Chemosphere.* 212 (2018) 890–897. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.153>.
- [46] W.A. da Costa, C.E. de Araújo Padilha, J.M. de Medeiros Dantas, M.M.C.L. Silva, H.A. de Oliveira Rocha, F.L.H. da Silva, M. Ferrari, E.S. dos Santos, Fractional recovery of oleaginous bioactive produced by *Rhodotorula mucilaginosa* CCT3892 using deep eutectic solvents, *Bioresour Technol Rep.* 12 (2020) 100561. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100561>.
- [47] R. Ahmadi, B. Hemmateenejad, A. Safavi, Z. Shojaeifard, M. Mohabbati, O. Firuzi, Assessment of cytotoxicity of choline chloride-based natural deep eutectic solvents against human HEK-293 cells: A QSAR analysis, *Chemosphere.* 209 (2018) 831–838. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.103>.
- [48] D. Lapeña, D. Errazquin, L. Lomba, C. Lafuente, B. Giner, Ecotoxicity and biodegradability of pure and aqueous mixtures of deep eutectic solvents: glyceline, ethaline, and reline, *Environmental Science and Pollution Research.* 28 (2021) 8812–8821. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11144-w>.
- [49] Q. Wen, J.X. Chen, Y.L. Tang, J. Wang, Z. Yang, Assessing the toxicity and biodegradability of deep eutectic solvents, *Chemosphere.* 132 (2015) 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.061>.
- [50] N. Cabaleiro, I. de la Calle, C. Bendicho, I. Lavilla, Current trends in liquid–liquid and solid–liquid extraction for cosmetic analysis: a review, *Anal. Methods.* 5 (2013) 323–340. <https://doi.org/10.1039/C2AY25830G>.
- [51] S. Ruggeri, F. Poletti, C. Zanardi, L. Pigani, B. Zanfognini, E. Corsi, N. Dossi, M. Salomäki, H. Kivelä, J. Lukkari, F. Terzi, Chemical and electrochemical properties of a hydrophobic deep eutectic solvent, *Electrochim Acta.* 295 (2019) 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.10.086>.
- [52] N. Schaeffer, H. Passos, I. Billard, N. Papaiconomou, J.A.P. Coutinho, Recovery of metals from waste electrical and electronic equipment (WEEE) using unconventional solvents based on ionic liquids, *Crit Rev Environ Sci Technol.* 48 (2018) 859–922. <https://doi.org/10.1080/10643389.2018.1477417>.
- [53] E. Habibi, K. Ghanemi, M. Fallah-Mehrjardi, A. Dadolahi-Sohrab, A novel digestion method based on a choline chloride–oxalic acid deep eutectic solvent for determining Cu, Fe, and Zn in fish samples, *Anal Chim Acta.* 762 (2013) 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.054>.
- [54] B. Doğan, A. Elik, N. Altunay, Determination of paracetamol in synthetic urea and pharmaceutical samples by shaker-assisted deep eutectic solvent

- microextraction and spectrophotometry, *Microchemical Journal*. 154 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104645>.
- [55] N. Faraz, H.U. Haq, M. Balal Arain, R. Castro-Muñoz, G. Boczkaj, A. Khan, Deep eutectic solvent based method for analysis of Niclosamide in pharmaceutical and wastewater samples – A green analytical chemistry approach, *J Mol Liq*. 335 (2021) 116142. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116142>.
- [56] Y. Dai, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*), *Food Chem.* 159 (2014) 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.155>.
- [57] Q. Zeng, Y. Wang, Y. Huang, X. Ding, J. Chen, K. Xu, Deep eutectic solvents as novel extraction media for protein partitioning, *Analyst*. 139 (2014) 2565. <https://doi.org/10.1039/c3an02235h>.
- [58] Z. Helalat–Nezhad, K. Ghanemi, M. Fallah–Mehrzardi, Dissolution of biological samples in deep eutectic solvents: An approach for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons followed by liquid chromatography-fluorescence detection, *J Chromatogr A*. 1394 (2015) 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.03.053>.
- [59] H. Wang, Q. Xu, J. Jiao, H. Wu, A solidified floating organic drop-dispersive liquid–liquid microextraction based on *in situ* formed fatty acid-based deep eutectic solvents for the extraction of benzophenone-UV filters from water samples, *New Journal of Chemistry*. 45 (2021) 14082–14090. <https://doi.org/10.1039/D1NJ01393A>.
- [60] A.G. Moghadam, M. Rajabi, A. Asghari, Efficient and relatively safe emulsification microextraction using a deep eutectic solvent for influential enrichment of trace main anti-depressant drugs from complicated samples, *Journal of Chromatography B*. 1072 (2018) 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.09.042>.
- [61] H. Sereshti, M. Zarei-Hosseiniabadi, S. Soltani, F. Jamshidi, M.H. Shojae AliAbadi, Hydrophobic liquid-polymer-based deep eutectic solvent for extraction and multi-residue analysis of pesticides in water samples, *Microchemical Journal*. 167 (2021) 106314. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106314>.
- [62] K.M. Jeong, Y. Jin, D.E. Yoo, S.Y. Han, E.M. Kim, J. Lee, One-step sample preparation for convenient examination of volatile monoterpenes and phenolic compounds in peppermint leaves using deep eutectic solvents, *Food Chem.* 251 (2018) 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.079>.
- [63] J. Wang, Y. Zhou, M. Wang, W. Bi, H. Li, D.D.Y. Chen, High-Throughput Analysis for Artemisinins with Deep Eutectic Solvents Mechanochemical Extraction and Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry, *Anal Chem*. 90 (2018) 3109–3117. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04060>.

- [64] M. Espino, M. de los Á. Fernández, F.J.V. Gomez, J. Boiteux, M.F. Silva, Green analytical chemistry metrics: Towards a sustainable phenolics extraction from medicinal plants, *Microchemical Journal*. 141 (2018) 438–443. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.06.007>.
- [65] M.F.A. El-Maati, S.A. Mahgoub, S.M. Labib, A.M.A. Al-Gaby, M.F. Ramadan, Phenolic extracts of clove (*Syzygium aromaticum*) with novel antioxidant and antibacterial activities, *Eur J Integr Med*. 8 (2016) 494–504. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2016.02.006>.
- [66] M.Z. Gao, Q. Cui, L.T. Wang, Y. Meng, L. Yu, Y.Y. Li, Y.J. Fu, A green and integrated strategy for enhanced phenolic compounds extraction from mulberry (*Morus alba* L.) leaves by deep eutectic solvent, *Microchemical Journal*. 154 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104598>.
- [67] M.J.R. Vaquero, M.R. Alberto, M.C.M. de Nadra, Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines, *Food Control*. 18 (2007) 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.08.010>.
- [68] E. Dalmau, C. Rosselló, V. Eim, C. Ratti, S. Simal, Ultrasound-assisted aqueous extraction of biocompounds from orange byproduct: Experimental kinetics and modeling, *Antioxidants*. 9 (2020). <https://doi.org/10.3390/antiox9040352>.
- [69] M. Wang, N. Jiang, Y. Wang, D. Jiang, X. Feng, Characterization of Phenolic Compounds from Early and Late Ripening Sweet Cherries and Their Antioxidant and Antifungal Activities, *J Agric Food Chem*. 65 (2017) 5413–5420. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01409>.
- [70] L. Socrier, A. Quéro, M. Verdu, Y. Song, R. Molinié, D. Mathiron, S. Pilard, F. Mesnard, S. Morandat, Flax phenolic compounds as inhibitors of lipid oxidation: Elucidation of their mechanisms of action, *Food Chem*. 274 (2019) 651–658. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.126>.
- [71] G. Simonetti, E. Brasili, G. Pasqua, Antifungal Activity of Phenolic and Polyphenolic Compounds from Different Matrices of *Vitis vinifera* L. Against Human Pathogens, *Molecules*. 25 (2020). <https://doi.org/10.3390/molecules25163748>.
- [72] S. Maqsood, S. Benjakul, Comparative studies of four different phenolic compounds on in vitro antioxidative activity and the preventive effect on lipid oxidation of fish oil emulsion and fish mince, *Food Chem*. 119 (2010) 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.06.004>.
- [73] O. Sagdic, I. Ozturk, G. Ozkan, H. Yetim, L. Ekici, M.T. Yilmaz, RP-HPLC-DAD analysis of phenolic compounds in pomace extracts from five grape cultivars: Evaluation of their antioxidant, antiradical and antifungal activities in orange and apple juices, *Food Chem*. 126 (2011) 1749–1758. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.075>.
- [74] C.B. Cheila, G.L. dos Anjos, R.S.A. Nóbrega, A. da S. Magaton, F.M. de Miranda, F. de S. Dias, Greener ultrasound-assisted extraction of bioactive

- phenolic compounds in *Croton heliotropiifolius* Kunth leaves, *Microchemical Journal*. 159 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105525>.
- [75] S.V.F. Gomes, L.A. Portugal, J.P. dos Anjos, O.N. de Jesus, E.J. de Oliveira, J.P. David, J.M. David, Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species, *Microchemical Journal*. 132 (2017) 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.12.021>.
- [76] D. Ezez, M. Tefera, Effects of Solvents on Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Ginger Extracts, *J Chem*. 2021 (2021). <https://doi.org/10.1155/2021/6635199>.
- [77] A. Mokrani, K. Madani, Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit, *Sep Purif Technol*. 162 (2016) 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.01.043>.
- [78] M.K. de A. Mendes, C.B. dos S. Oliveira, M.D.A. Veras, B.Q. Araújo, C. Dantas, M.H. Chaves, C.A. Lopes Júnior, E.C. Vieira, Application of multivariate optimization for the selective extraction of phenolic compounds in cashew nuts (*Anacardium occidentale* L.), *Talanta*. 205 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.06.100>.
- [79] L. Loarce, R. Oliver-Simancas, L. Marchante, M.C. Díaz-Maroto, M.E. Alañón, Implementation of subcritical water extraction with natural deep eutectic solvents for sustainable extraction of phenolic compounds from winemaking by-products, *Food Research International*. 137 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109728>.
- [80] H. Mahmood, M. Moniruzzaman, T. Iqbal, M.J. Khan, Recent advances in the pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and value-added products, *Curr Opin Green Sustain Chem*. 20 (2019) 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.08.001>.
- [81] G. Velvizhi, K. Balakumar, N.P. Shetti, E. Ahmad, K. Kishore Pant, T.M. Aminabhavi, Integrated biorefinery processes for conversion of lignocellulosic biomass to value added materials: Paving a path towards circular economy, *Bioresour Technol*. 343 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126151>.
- [82] A.M. Da Costa Lopes, M. Brenner, P. Falé, L.B. Roseiro, R. Bogel-Lukasik, Extraction and Purification of Phenolic Compounds from Lignocellulosic Biomass Assisted by Ionic Liquid, Polymeric Resins, and Supercritical CO₂, *ACS Sustain Chem Eng*. 4 (2016) 3357–3367. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00429>.
- [83] M.A. Alam, G. Muhammad, M.N. Khan, M. Mofijur, Y. Lv, W. Xiong, J. Xu, Choline chloride-based deep eutectic solvents as green extractants for the isolation of phenolic compounds from biomass, *J Clean Prod*. 309 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127445>.

- [84] X. Rico, B. Gullón, J.L. Alonso, R. Yáñez, Recovery of high value-added compounds from pineapple, melon, watermelon and pumpkin processing by-products: An overview, *Food Research International*. 132 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109086>.
- [85] J.G. Handique, J.B. Baruah, Polyphenolic compounds: an overview, 2002. www.elsevier.com/locate/react.
- [86] E. Méndez-Loranca, A.M. Vidal-Ruiz, O. Martínez-González, C.A. Huerta-Aguilar, J.A. Gutierrez-Urbe, Beyond cellulose extraction: Recovery of phytochemicals and contaminants to revalorize agricultural waste, *Bioresour Technol Rep*. 21 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101339>.
- [87] L. Sepúlveda, A. Romani, C.N. Aguilar, J. Teixeira, Valorization of pineapple waste for the extraction of bioactive compounds and glycosides using autohydrolysis, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 47 (2018) 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.01.012>.
- [88] M.R. da Silva, R.E. Jelley, R.L. Carneiro, B. Fedrizzi, C.C. Weber, C.S. Funari, Green solvents for the selective extraction of bioactive compounds from by-products of the coffee production chain, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 86 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2023.103365>.
- [89] M. V. Rodionova, A.M. Bozieva, S.K. Zharmukhamedov, Y.K. Leong, J. Chi-Wei Lan, A. Veziroglu, T.N. Veziroglu, T. Tomo, J.S. Chang, S.I. Allakhverdiev, A comprehensive review on lignocellulosic biomass biorefinery for sustainable biofuel production, *Int J Hydrogen Energy*. 47 (2022) 1481–1498. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.10.122>.
- [90] B. Kumar, N. Bhardwaj, K. Agrawal, V. Chaturvedi, P. Verma, Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept, *Fuel Processing Technology*. 199 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.106244>.
- [91] A.T. Hoang, S. Nizetic, H.C. Ong, C.T. Chong, A.E. Atabani, V.V. Pham, Acid-based lignocellulosic biomass biorefinery for bioenergy production: Advantages, application constraints, and perspectives, *J Environ Manage*. 296 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113194>.
- [92] A. Ullah, Y. Zhang, C. Liu, Q. Qiao, Q. Shao, J. Shi, Process intensification strategies for green solvent mediated biomass pretreatment, *Bioresour Technol*. 369 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128394>.
- [93] K. Malik, P. Sharma, Y. Yang, P. Zhang, L. Zhang, X. Xing, J. Yue, Z. Song, L. Nan, S. Yujun, M.M. El-Dalatony, E.S. Salama, X. Li, Lignocellulosic biomass for bioethanol: Insight into the advanced pretreatment and fermentation approaches, *Ind Crops Prod*. 188 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115569>.
- [94] S. Rezania, B. Oryani, J. Cho, A. Talaiekhosravi, F. Sabbagh, B. Hashemi, P.F. Rupani, A.A. Mohammadi, Different pretreatment technologies of lignocellulosic

- biomass for bioethanol production: An overview, *Energy*. 199 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.117457>.
- [95] S. Periyasamy, J. Beula Isabel, S. Kavitha, V. Karthik, B.A. Mohamed, D.G. Gizaw, P. Sivashanmugam, T.M. Aminabhavi, Recent advances in consolidated bioprocessing for conversion of lignocellulosic biomass into bioethanol – A review, *Chemical Engineering Journal*. 453 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.139783>.
- [96] V. Ashokkumar, R. Venkatkarthick, S. Jayashree, S. Chuetor, S. Dharmaraj, G. Kumar, W.H. Chen, C. Ngamcharussrivichai, Recent advances in lignocellulosic biomass for biofuels and value-added bioproducts - A critical review, *Bioresour Technol*. 344 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126195>.
- [97] V.T. Ribeiro, A.C. Campolina, W.A. da Costa, C.E. de Araújo Padilha, J.D.B. da Costa Filho, A.L.O. de Sá Leitão, J. da Câmara Rocha, E.S. dos Santos, Ethanol production from green coconut fiber using a sequential steam explosion and alkaline pretreatment, *Biomass Convers Biorefin*. (2022). <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03100-0>.
- [98] S.R. Dionísio, D.C.J. Santoro, C.I.D.G. Bonan, L.B. Soares, L.E. Biazzi, S.C. Rabelo, J.L. Ienczak, Second-generation ethanol process for integral use of hemicellulosic and cellulosic hydrolysates from diluted sulfuric acid pretreatment of sugarcane bagasse, *Fuel*. 304 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121290>.
- [99] S. Sethupathy, G. Murillo Morales, L. Gao, H. Wang, B. Yang, J. Jiang, J. Sun, D. Zhu, Lignin valorization: Status, challenges and opportunities, *Bioresour Technol*. 347 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126696>.
- [100] Wahyudiono, M. Sasaki, M. Goto, Recovery of phenolic compounds through the decomposition of lignin in near and supercritical water, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 47 (2008) 1609–1619. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2007.09.001>.
- [101] A. Varilla-Mazaba, J.A. Raggazo-Sánchez, M. Calderón-Santoyo, J. Gómez-Rodríguez, M.G. Aguilar-Uscanga, Optimization of lignin extraction by response surface methodology from sugarcane bagasse using deep eutectic solvents (DES), *Ind Crops Prod*. 184 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115040>.
- [102] N. Wang, B. Xu, X. Wang, J. Lang, H. Zhang, Chemical and Structural Elucidation of Lignin and Cellulose Isolated Using DES from Bagasse Based on Alkaline and Hydrothermal Pretreatment, *Polymers (Basel)*. 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/polym14142756>.
- [103] X. Rico, B. Gullón, J.L. Alonso, R. Yáñez, Recovery of high value-added compounds from pineapple, melon, watermelon and pumpkin processing by-products: An overview, *Food Research International*. 132 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109086>.

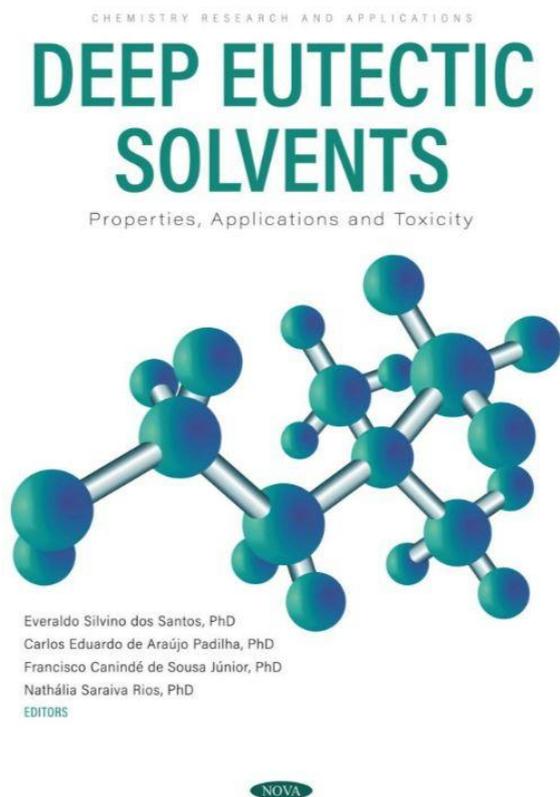
- [104] TABELA-Produção brasileira de abacaxi em 2021 Região Área Quantidade Rendimento Participação fisiográfica colhida produzida médio na produção (ha) (mil frutos) (frutos/ha), n.d.
- [105] A. Nor Halaliza, A. Zulkifly, Pengekstrakan sebatian fenolik daripada kulit nenas dengan bantuan gelombang mikro: Pengoptimuman keadaan pengendalian dan perbandingan dengan pengekstrakan soxhlet, *Malaysian Journal of Analytical Sciences*. 21 (2017) 690–699. <https://doi.org/10.17576/mjas-2017-2103-18>.
- [106] C.L. Vargas-Serna, C.I. Ochoa-Martínez, C. Vélez-Pasos, Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Pineapple Peel Using Deep Eutectic Solvents, *Horticulturae*. 8 (2022). <https://doi.org/10.3390/horticulturae8090791>.
- [107] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), M07-A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Tenth Edition, 2015. www.clsi.org.
- [108] Á. Santana-Mayor, R. Rodríguez-Ramos, A. v. Herrera-Herrera, B. Socas-Rodríguez, M.Á. Rodríguez-Delgado, Deep eutectic solvents. The new generation of green solvents in analytical chemistry, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 134 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116108>.
- [109] N.F. Gajardo-Parra, M.J. Lubben, J.M. Winnert, Á. Leiva, J.F. Brennecke, R.I. Canales, Physicochemical properties of choline chloride-based deep eutectic solvents and excess properties of their pseudo-binary mixtures with 1-butanol, *Journal of Chemical Thermodynamics*. 133 (2019) 272–284. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2019.02.010>.
- [110] V. Migliorati, F. Sessa, P. D'Angelo, Deep eutectic solvents: A structural point of view on the role of the cation, *Chemical Physics Letters: X*. 2 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.cpletx.2018.100001>.
- [111] L. Rogers, K.F. Jensen, Continuous manufacturing-the Green Chemistry promise?, *Green Chemistry*. 21 (2019) 3481–3498. <https://doi.org/10.1039/c9gc00773c>.
- [112] J.M. Silva, E. Silva, R.L. Reis, A.R.C. Duarte, A closer look in the antimicrobial properties of deep eutectic solvents based on fatty acids, *Sustain Chem Pharm*. 14 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.scp.2019.100192>.
- [113] J. Płotka-Wasyłka, M. Rutkowska, M. de la Guardia, Are deep eutectic solvents useful in chromatography? A short review, *J Chromatogr A*. 1639 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461918>.
- [114] A.T. Sutton, K. Fraige, G.M. Leme, V. da Silva Bolzani, E.F. Hilder, A.J. Cavalheiro, R.D. Arrua, C.S. Funari, Natural deep eutectic solvents as the major mobile phase components in high-performance liquid chromatography—searching for alternatives to organic solvents, *Anal Bioanal Chem*. 410 (2018) 3705–3713. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1027-5>.

- [115] D. Raj, Thin-layer chromatography with eutectic mobile phases—preliminary results, *J Chromatogr A*. 1621 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461044>.
- [116] A.M. Ramezani, R. Ahmadi, G. Absalan, Designing a sustainable mobile phase composition for melamine monitoring in milk samples based on micellar liquid chromatography and natural deep eutectic solvent, *J Chromatogr A*. 1610 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460563>.
- [117] Y. Chen, W. Chen, L. Fu, Y. Yang, Y. Wang, X. Hu, F. Wang, T. Mu, Surface Tension of 50 Deep Eutectic Solvents: Effect of Hydrogen-Bonding Donors, Hydrogen-Bonding Acceptors, Other Solvents, and Temperature, *Ind Eng Chem Res*. 58 (2019) 12741–12750. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b00867>.
- [118] Y. Chen, L. Fu, Z. Liu, F. Dai, Z. Dong, D. Li, H. Liu, D. Zhao, Y. Lou, Surface tension and surface thermodynamic properties of PEG-based deep eutectic solvents, *J Mol Liq*. 318 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114042>.
- [119] J. Torregrosa-Crespo, X. Marset, G. Guillena, D.J. Ramón, R. María Martínez-Espinosa, New guidelines for testing “Deep eutectic solvents” toxicity and their effects on the environment and living beings, *Science of the Total Environment*. 704 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135382>.
- [120] Instituto Adolf Lutz, Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos, Instituto Adolf Lutz, São Paulo, 2008.
- [121] I.R. Maldonade, P.G.B. Carvalho, N.A. Ferreira, Comunicado Técnico 85 Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS, (2013).
- [122] A.T. Atayoglu, D. Sözeri Atik, E. Bölük, B. Gürbüz, F.D. Ceylan, E. Çapanoğlu, R. Atayolu, A. Paradkar, J. Fearnley, I. Palabiyik, Evaluating bioactivity and bioaccessibility properties of the propolis extract prepared with L-lactic acid: An alternative solvent to ethanol for propolis extraction, *Food Biosci*. 53 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102756>.
- [123] J. Santos, P. Torres, F. Chow, D. Santos, Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas Chemical characterization and biological activities of some native species of *Gracilaria* with economic importance View project, (n.d.). <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.29127.80809>.
- [124] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, D. Crocker, Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP) (Revised July 2011), 2008. http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html.
- [125] M. Ivanović, M.E. Alañón, D. Arráez-Román, A. Segura-Carretero, Enhanced and green extraction of bioactive compounds from *Lippia citriodora* by tailor-made natural deep eutectic solvents, *Food Research International*. 111 (2018) 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.014>.

- [126] M.C. Ali, J. Chen, H. Zhang, Z. Li, L. Zhao, H. Qiu, Effective extraction of flavonoids from *Lycium barbarum* L. fruits by deep eutectic solvents-based ultrasound-assisted extraction, *Talanta*. 203 (2019) 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.012>.
- [127] J.P. Wojeicchowski, C. Marques, L. Igarashi-Mafra, J.A.P. Coutinho, M.R. Mafra, Extraction of phenolic compounds from rosemary using choline chloride – based Deep Eutectic Solvents, *Sep Purif Technol.* 258 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117975>.
- [128] Y.H. Hsieh, Y. Li, Z. Pan, Z. Chen, J. Lu, J. Yuan, Z. Zhu, J. Zhang, Ultrasonication-assisted synthesis of alcohol-based deep eutectic solvents for extraction of active compounds from ginger, *Ultrason Sonochem.* 63 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104915>.
- [129] W.A. da Costa, V.F. de França, L.S. da Silva Souza, A.S.A. de Andrade, D.A.M. de Araújo, E.D.T. Moreira, L.F.B.L. Pontes, Physical–chemical and ecotoxic evaluation of different deep eutectic solvents for green analytical applications, *Environmental Science and Pollution Research*. 30 (2023) 70701–70712. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-27398-z>.
- [130] A. Mokrani, K. Madani, Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit, *Sep Purif Technol.* 162 (2016) 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.01.043>.
- [131] G.G. Zampar, I.C. Zampar, S. Beserra da Silva de Souza, C. da Silva, B.C. Bolanho Barros, Effect of solvent mixtures on the ultrasound-assisted extraction of compounds from pineapple by-product, *Food Biosci.* 50 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102098>.
- [132] Q. Ji, X. Yu, A.E.G.A. Yagoub, L. Chen, A.T. Mustapha, C. Zhou, Enhancement of lignin removal and enzymolysis of sugarcane bagasse by ultrasound-assisted ethanol synergized deep eutectic solvent pretreatment, *Renew Energy*. 172 (2021) 304–316. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2021.03.050>.
- [133] M. Parchami, S. Agnihotri, M.J. Taherzadeh, Aqueous ethanol organosolv process for the valorization of Brewer’s spent grain (BSG), *Bioresour Technol.* 362 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127764>.
- [134] Z. Guo, J. Mao, Q. Zhang, F. Xu, Integrated biorefinery of bamboo for fermentable sugars, native-like lignin, and furfural production by novel deep eutectic solvents treatment, *Ind Crops Prod.* 188 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115453>.
- [135] Y. Oh, S. Park, D. Jung, K.K. Oh, S.H. Lee, Effect of hydrogen bond donor on the choline chloride-based deep eutectic solvent-mediated extraction of lignin from pine wood, *Int J Biol Macromol.* 165 (2020) 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.145>.

- [136] N. Nordin, R. Md Illias, N.H.A. Manas, A.N.M. Ramli, R. Selvasembian, N.I.W. Azelee, R. Rajagopal, A. Thirupathi, S.W. Chang, B. Ravindran, Highly sustainable cascade pretreatment of low-pressure steam heating and organic acid on pineapple waste biomass for efficient delignification, *Fuel*. 321 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.124061>.
- [137] M. Hadidi, P.I. Amoli, A.Z. Jelyani, Z. Hasiri, A. Rouhafza, A. Ibarz, F.B. Khaksar, S.T. Tabrizi, Polysaccharides from pineapple core as a canning by-product: Extraction optimization, chemical structure, antioxidant and functional properties, *Int J Biol Macromol*. 163 (2020) 2357–2364. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.092>.
- [138] M.A. Guancha-Chalapud, L. Serna-Cock, D.F. Tirado, Valorization of Pineapple Residues from the Colombian Agroindustry to Produce Cellulose Nanofibers, *Applied Sciences (Switzerland)*. 12 (2022). <https://doi.org/10.3390/app12146956>.
- [139] L.U.S. Faria, B.J.S. Pacheco, G.C. Oliveira, J.L. Silva, Production of cellulose nanocrystals from pineapple crown fibers through alkaline pretreatment and acid hydrolysis under different conditions, *Journal of Materials Research and Technology*. 9 (2020) 12346–12353. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.08.093>.
- [140] J.Z. Liu, H.C. Lyu, Y.J. Fu, J.C. Jiang, Q. Cui, Simultaneous extraction of natural organic acid and flavonoid antioxidants from *Hibiscus manihot* L. flower by tailor-made deep eutectic solvent, *LWT*. 163 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113533>.
- [141] Y. Liu, J. Li, R. Fu, L. Zhang, D. Wang, S. Wang, Enhanced extraction of natural pigments from *Curcuma longa* L. using natural deep eutectic solvents, *Ind Crops Prod*. 140 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111620>.

ANEXO I – Capítulo de Livro Publicado (Oriundo da Tese):



Chapter 4

Use of Deep Eutectic Solvents in Samples Preparation

W. A. da Costa¹, A. G. G. Pessoa² and L. F. B. L. Pontes^{1,*}

¹Center for Exact Sciences and Nature, Department of Chemistry, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

²Biotechnology Center, Department of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

Abstract

Direct sample analysis, without any preliminary treatment, is considered an ideal condition for an analyst once target analyte determination might be realized in an analytical sequence with fewer steps. However, there are few types of equipment endowed with satisfactory efficiency for in-field measurements. Therefore, the sample preparation step is still crucial, and one of the most important stages for a well-done chemical analysis. An appropriated sample preparation must consider analyte representativity in the sample matrix and, at the same time, avoid the obtention of inexact results attached to low precision. The present chapter describes strategies that might be efficient in sample preparation, mainly in extraction and digestion procedure of solid and liquid samples, using Deep Eutectic Solvents (DES). This low-vapor-pressure solvent class composes a category of liquids obtained by Bronsted-Lowry's acid-base reaction. These protic-solvents can interact, by hydrogen bonds interaction, with a large range of chemical classes. Given the mentioned, the proposal is to present a review of the theoretical and practical aspects of DES using in sample preparation strategies, highlighting their composition, polarity, and low-toxicity influence on process sustainability and viability. The idea is to approach the theme through a didactic point of view aiming to contribute as a source of information to industry professionals, researchers, and students of analytical chemistry.

Keywords: sample preparation, extraction procedures, deep eutectic solvents, analytical chemistry, protic-solvents

Introduction

Sample Preparation: General Considerations

Determining the constituents in a sample is a procedure that requires a sequence of steps expected to guarantee an analysis with accurate and precise measurements. Performing an



Physical–chemical and ecotoxic evaluation of different deep eutectic solvents for green analytical applications

Willyan Araújo da Costa¹ · Vanessa Freire de França¹ · Layanny Samara da Silva Souza¹ · Adrielly Silva Albuquerque de Andrade² · Demetrius Antonio Machado de Araújo² · Edilene Dantas Teles Moreira³ · Líliliana Fátima Bezerra Lira Pontes¹

Received: 6 March 2023 / Accepted: 29 April 2023 / Published online: 8 May 2023
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

Abstract

The search for new analytical methods is a latent reality in the so-called green analytical chemistry area, which aims at correlating analytical demands to environmental issues. Among the approaches used, it is possible to highlight green solvents as substitutes to the dangerous and conventional organic solvents as the most prominent alternative for this purpose. In the last few years, the amount of research focused on the usage of deep eutectic solvents (DESs) has been growing as an alternative to these issues. Thus, this work aimed to investigate the main physical–chemical and ecotoxicological properties of seven different DESs. The results showed that DESs' evaluated properties are influenced by the chemical structure of their precursors, which may regulate DESs' viscosity, superficial tension, and antagonistic action against vegetable tissues and microbial cells. The constataions pointed here introduce a new perspective about the conscious usage of DESs on a green analytical point of view.

Keywords Physical–chemical properties · Ecotoxic profile · Minimal inhibitory capacity · Rheological behavior · Deep eutectic solvents · Green analytical chemistry

Introduction

The current preoccupations about environmental issues have been leading several sectors of the society to search new strategic alternatives able to guarantee the maintenance of our vital actives without leading to a full exhaustion of the available natural resources. In the chemistry field, and of chemical process, this perspective is attached to the so-called green chemistry, an approach that has been receiving more space in scientific research, which leads to increasingly

more sustainable procedures (Tobiszewski et al. 2015; Rogers and Jensen 2019; de Marco et al. 2019).

An example of this trend is the growing number of research works associated to the development of analytical methodologies where the center of discussion is the replacement of toxic reactants and solvent (Fernández et al. 2018; Armenta et al. 2019).

Nowadays, in analytical chemistry laboratories, one of the most required procedures, with no doubts, is the sample preparation. The sample direct analysis would be a perfect condition for any analyst. However, a treatment stage, for example, due to the instrumental requirements or due to the presence of analyte(s) in trace levels, is almost always necessary. About this point, the main challenge is the replacement of traditional organic solvents (TOS) for less dangerous alternatives which can keep the desired analytical parameters (Armenta et al. 2019; Pacheco-Fernández and Pino 2019).

In green analytical chemistry, when a solvent is used for the establishment of new methodologies, some parameters are considered as very important, such as great partition capacity in relation to target analyte, non-volatility, adequate viscosity for instrumental usage, easy storage requirement, and biodegradability. However, specific parameters, attached

Responsible Editor: George Z. Kyzas

✉ Líliliana Fátima Bezerra Lira Pontes
liliana.lira@quimica.ufpb.br

¹ Department of Chemistry, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa/Paraíba 58051-970, Brazil

² Department of Biotechnology, Center of Biotechnology, Federal University of Paraíba, João Pessoa/Paraíba, Brazil

³ Department of Chemistry and Physics, Center of Agrarian Sciences, Federal University of Paraíba, Arcaia/Paraíba, Brazil