

AMANDA CRISTINA SANTOS DIAS

**EXTRAÇÃO DE BETANINA EM BETERRABA (*Beta vulgaris*) UTILIZANDO
SOLVENTES ALTERNATIVOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do Título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Antônio Jacinto Demuner

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2019**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S237e
2019
Dias, Amanda Cristina Santos, 1992-
Extração de betanina em beterraba (*Beta vulgaris*)
utilizando solventes alternativos e avaliação da atividade
antioxidante / Amanda Cristina Santos Dias. – Viçosa, MG,
2019.

52 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Antônio Jacinto Demuner.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 46-52.

1. Solventes. 2. *Beta vulgaris*. 3. Antioxidantes.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química.
Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 541.3482

AMANDA CRISTINA SANTOS DIAS

**EXTRAÇÃO DE BETANINA EM BETERRABA (*Beta vulgaris*) UTILIZANDO
SOLVENTES ALTERNATIVOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada a Universidade
Federal de Viçosa como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica, para obtenção do Título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 20 de setembro de 2019.


Amanda Cristina Santos Dias
Autora


Antônio Jacinto Demuner
Orientador

A minha madrinha Claudinéia Ramos

AGRADECIMENTOS

A Deus por seu imenso amor.

À minha madrinha Claudinéia Ramos, minha irmã Rafaela Santos e ao meu pai Alexandre Dias pelo carinho, incentivo e amparo imensurável.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Química pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo concedida.

Ao professor Antônio Jacinto Demuner pela orientação, conselhos e confiança.

À professora Rita Superbi pelo empenho no desenvolvimento da pesquisa.

Ao professor César Reis pelo auxílio com as análises estatísticas.

Ao professor Paulo Stringheta por ter cedido, gentilmente, o padrão de betanina.

À Pós-doutoranda Daiane Blanck pelo apoio em todas as etapas desta pesquisa.

Aos técnicos, José Luiz e Márcio, pela obtenção dos espectros.

À professora Kelly Dantas da Universidade Federal do Pará por ter aberto o caminho para eu realizar o mestrado em Agroquímica na Universidade Federal de Viçosa.

Às minhas companheiras da República Apto 101, Mariane, Jéssica, Elizeth, Francielly, Jordana e Paloma pelo bom convívio e amizade em Viçosa-MG.

A todos os professores, funcionários, amigos e colegas que participaram da minha formação pessoal e profissional.

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

DIAS, Amanda Cristina Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2019. **Extração de betanina em beterraba (*Beta vulgaris*) utilizando solventes alternativos e avaliação da atividade antioxidante.** Orientador: Antônio Jacinto Demuner.

Os solventes eutéticos profundos (SEPs) são solventes alternativos utilizados na extração de substâncias bioativas de produtos naturais especialmente de origem vegetal substituindo solventes orgânicos convencionais, contribuindo com meio ambiente e apresentando eficiência na extração. A betanina é uma substância presente em espécies vegetais que é extraída geralmente com solventes orgânicos convencionais voláteis e tóxicos. Essa substância bioativas, apresenta diversas atividades biológicas dentre elas atividade antioxidante, sendo um produto natural de interesse para a indústria de farmacêutica e de alimentos, podendo ser empregado como corante e antioxidante natural. Nesse sentido, o objetivo do estudo foi otimizar a extração de betanina de beterraba (*Beta vulgaris*) com solventes eutéticos profundos. Para otimizar as extrações foi empregado a metodologia de superfície de resposta visando a quantificação a betanina extraída pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) e para avaliar o potencial antioxidante dos extratos de beterraba pelos métodos de poder redutor e sequestrante de radicais livres DPPH. Como resultado, a extração com água obteve maior resultado, de 144 mg/100 g de beterraba, seguido de etanol/água (1:1), com 141,20 mg/100 g de beterraba. Já as extrações obtidas com os SEPs, o ChCl:Ac foi mais eficiente, com 111,93 mg/100 g de beterraba, seguido ChCl:G, com 82,47 mg/100 g e ChCl:U, com 60,75 mg/100 g. O extrato obtido com o SEP ChCl:G apresentou maior atividade antioxidante frente aos dois métodos estudados, isto é, a composição eutética e os componentes extraídos com o mesmo, proporcionaram maiores atividades antioxidantes. Os SEPs se apresentaram mais potentes em extrair betaninas do que os solventes convencionais testados. Portanto, podem ser usados como extração sustentável e segura para aplicações no isolamento e extrações de compostos bioativos.

Palavras-chave: Solvente eutético profundo. *Beta vulgaris*. Atividade antioxidante

ABSTRACT

DIAS, Amanda Cristina Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2019. **Extraction of betanin in beet (*Beta vulgaris*) using alternative solvents and evaluation of antioxidant activity.** Adviser: Antônio Jacinto Demuner.

Deep eutectic solvents (DESs) are alternative solvents used in the extraction of bioactive substances from natural products especially of plant origin replacing conventional organic solvents, contributing to the environment and showing extraction efficiency. Betanin is a substance present in plant species which is usually extracted with volatile and toxic conventional organic solvents. This bioactive substance has several biological activities, among them antioxidant activity, being a natural product of interest to the pharmaceutical and food industry, and can be used as a natural coloring and antioxidant. In this sense, the objective of the study was to optimize the extraction of beet betanin (*Beta vulgaris*) with deep eutectic solvents. In order to optimize the extractions, the response surface methodology was used to quantify betanin extracted by the high performance liquid chromatography technique (HPLC-UV) and to evaluate the antioxidant potential of the beet extracts by the radical reducing and sequestering power methods. DPPH free. As a result, water extraction yielded the highest result of 144 mg /100 g beet, followed by ethanol /water (1: 1) with 141.20 mg /100 g beet. As for the extractions obtained with DESs, ChCl:Ac was more efficient, with 111.93 mg /100 g of beet, followed by ChCl:G, with 82.47 mg /100 g and ChCl:U, with 60.75 mg /100 g. The extract obtained with DES ChCl:G showed higher antioxidant activity compared to the two studied methods, that is, the eutectic composition and the components extracted with it, provided higher antioxidant activities. DESs were more potent in extracting betanins than conventional solvents tested. Therefore, they can be used as sustainable and safe extraction for applications in isolation and extraction of bioactive compounds.

Keywords: Deep eutectic solvent. *Beta vulgaris*. Antioxidant activity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Beta vulgaris</i>	14
Figura 2 - Estrutura geral das betalaína. R_1 e R_2 = grupos alquilas ou arilas.....	16
Figura 3 - Proposta de biossíntese da betanina.....	16
Figura 4 - Estrutura geral das betacianinas vermelhas (R^1 = Glicosídeo; R^2 = H) e das betaxantinas amarelas (R^3 = H ou alquil e R^4 resíduos de aminoácidos).....	18
Figura 5 - Exemplo das interações na formação de um solvente eutético profundo.....	20
Figura 6 - Representação esquemática do ponto eutético de um diagrama de fases de dois componentes.....	20
Figura 7 - Curva analítica obtida por CLAE-UV para betanina na faixa de concentração entre 1,0 e 0,00625 mg ⁻¹	27
Figura 8 - Espectro no infravermelho dos três diferentes SEPs.....	29
Figura 9 - Cromatograma da composição de betalaínas em beterraba extraída com água em área x tempo (min).	31
Figura 10 - Cromatograma da composição de betalaínas em beterraba extraída com ChCl:Ac em área x tempo (min).	31
Figura 11 - Cromatograma da composição de betalaínas em beterraba extraída com ChCl:G em área x tempo (min).....	32
Figura 12 - Cromatograma da composição de betalaínas em beterraba extraída com ChCl:U em área x tempo (min).....	32
Figura 13 - Valores observados e preditos dos dados experimentais para betanina extraída com cloreto de colina: ácido cítrico	36
Figura 14 - Contorno das respostas para betanina extraída com cloreto de colina: ácido cítrico.....	36
Figura 15 - Valores observados e preditos dos dados experimentais para betanina extraída com cloreto de colina:glicerol.....	38
Figura 16 - Contorno das respostas para betanina extraída com cloreto de colina:glicerol.....	39
Figura 17 - Valores observados e preditos dos dados experimentais para betanina extraída com cloreto de colina:ureia.....	41
Figura 18 - Contorno das respostas para betanina extraída com cloreto de colina:ureia.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proporções para o preparo dos SEPs	23
Tabela 2 - Planejamento experimental para a otimização da extração de betanina em beterraba em função do tempo (X_1 ; min) e a proporção de solvente eutético profundo em água (X_2 ; %; v/v)	25
Tabela 3 - Teor de betanina mg/100 g extrações com diferentes solventes, ácidos e bases.....	29
Tabela 4 - Respostas obtidas de betanina nos 13 ensaios do planejamento estatístico.....	33
Tabela 5 - Coeficientes de regressão para o modelo construído para as variáveis de resposta de tempo e proporção de solvente de betanina extraída com cloreto de colina:ácido cítrico... ..	34
Tabela 6 - Análise de variância dos dados experimentais para betanina extraída com cloreto de colina:ácido cítrico.....	35
Tabela 7 - Coeficientes de regressão para o modelo construído para as variáveis de resposta de tempo e proporção de solvente de betanina extraída com cloreto de colina:glicerol.....	37
Tabela 8 - Análise de variância dos dados experimentais para betanina extraída com cloreto de colina:glicerol.	38
Tabela 9 - Coeficientes de regressão para o modelo construído para as variáveis de resposta de tempo e proporção de solvente de betanina extraída com cloreto de colina:ureia.	40
Tabela 10 - Análise de variância dos dados experimentais para betanina extraída com cloreto de colina:ureia.....	40
Tabela 11 - Valores da atividade antioxidante dos extratos de beterraba frente ao poder redutor.....	44
Tabela 12 - Valores da avaliação da atividade antioxidante dos extratos de beterraba frente ao DPPH.....	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS.....	13
2.1	Objetivo geral.....	13
2.2	Objetivos específicos.....	13
3	REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1	<i>Beta vulgaris</i>	14
3.2	Betalaínas.....	15
3.2.1	Betanina.....	18
3.3	Solventes Eutéticos Profundos (SEPs).....	20
3.4	Metodologia de superfície de resposta (MSR)	21
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1	Material Vegetal	23
4.2	Preparação do material vegetal.....	23
4.3	Preparo dos solventes eutéticos profundos (SEPs)	23
4.4	Espectroscopia no Infravermelho.....	23
4.5	Extrações com diferentes solventes, ácidos e bases.....	23
4.6	Planejamento experimental	24
4.7	Extratos de beterraba para o planejamento experimental.....	25
4.8	Quantificação de betanina.....	25
4.9	Atividade antioxidante.....	27
4.9.1	Poder redutor.....	27
4.9.2	Poder sequestrante de radicais livres DPPH.....	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1	Perfil espectrométrico dos SEPs preparados.....	28
5.2	Teor de betanina em extrações com diferentes solventes, ácidos e bases.....	29
5.3	Perfil de betalaínas.....	30
5.4	Otimização da extração de betanina.....	33
5.4.1	Cloreto de colina:ácido cítrico.....	34
5.4.2	Cloreto de colina:glicerol.....	37
5.4.3	Cloreto de colina:ureia.....	39

5.5	Atividade antioxidante	42
6	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

Os procedimentos de extração geralmente empregam solventes orgânicos voláteis, tóxicos, muitas vezes com propriedades carcinogênicas. Além disso, apresentam baixo rendimento de extração e prejudica o meio ambiente com os resíduos gerados (OSCH *et al.*, 2015).

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas na química orgânica de produtos naturais desenvolvendo formulações de solventes menos nocivos ao ambiente para substituir os solventes orgânicos convencionais na extração de substâncias bioativas de espécies vegetais (CAO *et al.*, 2018).

A extração com solventes (métodos convencionais) são os mais utilizados para a extração de betanina. Porém as tecnologias emergentes como a extração com líquido pressurizado, extração com fluido supercrítico, extração por pulso elétrico, extração assistida por micro-ondas e extração assistida por ultrassom, já vêm sendo utilizadas na busca de processos com melhores características econômicas, ambientais, segurança e qualidade ao produto obtido (CORRALES *et al.*, 2008).

Para tanto, os solventes eutéticos profundos (SEP) são uma classe de solventes “verdes”, de fácil síntese, preparado a partir das misturas eutéticas oriundas de um sal de amônio com um composto que possa fazer ligações de hidrogênio, ou seja, um sal quaternário com um doador de ligação de hidrogênio (HBD) em temperatura ambiente, como ureia, ácido ou amina, de baixo custo e biodegradável, apresentando também toxicidade nula (DAI *et al.*, 2013; PENA-PEREIRA & NAMIESNIK, 2014; ANDREW *et al.*, 2017).

Na última década, a beterraba (*Beta vulgaris*) tem atraído muita atenção da população como um alimento funcional devido aos benefícios proporcionados a saúde humana (CLIFFORD *et al.*, 2016). Seu recente interesse foi impulsionado principalmente pela descoberta de que a beterraba é um dos poucos vegetais que contêm um grupo de pigmentos de avermelhada altamente bioativos conhecidos como betalaínas (FERREIRA *et al.*, 2017).

A betanina se degrada quando submetido a luz, calor e oxigênio. O teor de betanina na beterraba pode ser aprimorado pela seleção de variedades, condições de crescimento, tempo de colheita, etc. (BELLEBNA *et al.*, 2016). Entretanto, a purificação de grandes quantidades de qualquer betalaína é difícil devido à sua instabilidade (GONÇALVES *et al.*, 2012).

Em vista do potencial uso do solvente eutético profundo como alternativa “verde” aos solventes tradicionalmente empregados na pesquisa e indústria, neste estudo, foi realizada a extração de betanina da beterraba (*Beta vulgaris*) com solvente eutético profundo (SEP) em tratamentos acompanhados do melhor método de análise de variáveis. Essa metodologia é nova pois, não existem relatos na literatura do uso de SEP nas extrações de betanina de beterraba, evidenciando uma necessidade de estudo mais detalhado deste tipo de solvente nos processos de extração desta classe de compostos.

A metodologia de superfície de respostas (RSM) é uma técnica estatística útil para desenvolver, melhorar e otimizar processos (LIYANA-PATHIRANA & SHAHIDI, 2005). Tem sido utilizada com sucesso na otimização da extração de betalaínas de diferentes fontes (ALVES *et al.*, 2018).

Para este propósito foram utilizadas as raízes da beterraba (*Beta vulgaris*) que é uma hortaliça pertencente à família Chenopodiaceae, sendo considerada um alimento funcional, pois contém substâncias bioativas como o licopeno e alguns pigmentos como carotenoides, flavonoides e betalaína. Estas substâncias possuem propriedades antioxidantes e auxiliam na proteção contra doenças cardíacas, acidentes vasculares cerebrais, além de fortalecer o sistema imunológico (TIVELLI *et al.*, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Otimizar a extração de betanina de beterraba (*Beta vulgaris*) e avaliar a atividade antioxidante dos extratos obtidos.

2.1 Objetivos específicos

- Preparar e caracterizar por espectroscopia no infravermelho os solventes eutéticos profundos de cloreto de colina e ácido cítrico, cloreto de colina e glicerol e cloreto de colina e ureia;

- Otimizar a extração sólido-líquido de betanina de beterraba (*Beta vulgaris*), com solventes eutéticos profundos utilizando a metodologia de superfície de resposta, estudando as variáveis de tempo de extração e proporção de solvente eutético profundo.
- Obter os extratos após o tratamento das beterrabas com ultrassom;
- Comparar a extração de betanina de beterraba (*Beta vulgaris*) com diferentes misturas extratoras, como: água, metanol, etanol, etanol/água (1:1), bicarbonato de sódio 1 M, ácido acético 0,5%;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos de beterraba (*Beta vulgaris*) pelos métodos de poder redutor e de radicais livres DPPH.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Beta vulgaris*

A beterraba (*Beta vulgaris*) (Figura 1) pertence à família Chenopodiaceae. É um legume de raiz que cresce principalmente no chão com um topo de folhas sobre o solo (MARAN e PRIYA, 2016). Está bem distribuída em todo território brasileiro com uma produção anual de 135 mil toneladas. A região nordeste corresponde a produção com 15 mil toneladas ano (IBGE, 2018).

Figura 1 - *Beta vulgaris*



Fonte: Autora

Betalaínas estão presentes na parte tuberosa de beterrabas, conferindo sua coloração vermelho-púrpura (SILVA *et al.*, 2019). Além disso, a beterraba possui em sua composição

substâncias como carotenos, nitratos, flavonoides, vitaminas, minerais, como potássio, sódio, fósforo, cálcio, magnésio, cobre, ferro, zinco e manganês (BAJKACZ e ADAMEK, 2017).

Devido ao grande potencial antioxidante, as betalaínas ganharam novamente destaque na área de pesquisa nos últimos anos, apresentando altas contribuições para o entendimento das perdas por meio de processos oxidativo em plantas. Apesar de apresentar baixa estabilidade térmica (CARDOSO-UGARTE *et al.*, 2014; POLTURAK *et al.*, 2017), as betalaínas possuem capacidade antioxidante 1,5 a 2,0 vezes maior que as antocianinas, quando analisadas em pH 3,0 a 7,0, uma vez que as betalaínas mantem a estabilidade e a capacidade antioxidante nesta faixa de pH (BORKOWSKI *et al.*, 2005).

A beterraba é de grande importância para as indústrias de alimentos e farmacêutica, pois é utilizada principalmente como corante em alimentos e como fontes de antioxidantes para inserção em suplementos para atletas ou fortificantes nutricionais de alimentos processados (AMNAH *et al.*, 2013; MIKOLAJCZYK-BATOR e CZAPSKI, 2017; MONTENEGRO *et al.*, 2017).

Os pigmentos da beterraba são usados em misturas em pó devido a sua excelente solubilidade e boa estabilidade em produtos lácteos, como iogurtes e sorvetes, na confecção de balas, confeitaria e snacks (CONSTANT *et al.*, 2002). Dentre suas propriedades funcionais, as betalaínas caracterizam-se por apresentar propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas (HARLEV *et al.*, 2013; POLTURAK e AHARONI, 2018; KUMAR e BROOKS, 2018), antidiabéticas e anticancerígenas (GANDÍA-HERRERO *et al.*, 2016), na inibição da peroxidação lipídica e aumento da resistência à oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (GENGATHARAN *et al.*, 2015).

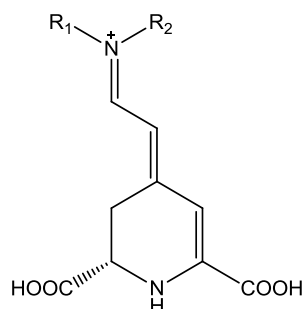
Estudos com diferentes linhas celulares demonstraram o potencial de betalaínas na quimioprevenção de câncer, e experiências *in vivo* mostraram que a dieta com estes pigmentos inibe a formação de tumores em camundongos (GANDÍA-HERRERO *et al.*, 2016).

3.2 Betalaínas

O termo betalaína foi introduzido pela primeira vez por Mabry e Dreiding (1968) e a essa classe de substâncias foram dadas diversas designações, incluindo cromoalcaloides. Apesar da presença do átomo de nitrogênio, não são classificadas como alcalóides, pois são de natureza ácida devido à presença de vários grupos carboxila (DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000).

As betalaínas são classificadas em betaxantinas (do latim *beta*, beterraba vermelha e do grego *xanthos* amarelo, pigmento amarelo) e betacianinas (do latim *beta*, beterraba vermelha e *kyanos*, cor azul, pigmento vermelho-púrpura) dependendo dos grupos ligados ao nitrogênio (STRACK *et al.*, 2003). As beterrabas são a principal fonte de betalaínas, um composto heterocíclico, nitrogenado e solúvel em água, que pode ser subdividido em duas classes de acordo com a sua estrutura química: betacianinas e betaxantinas (SAPONJAC *et al.*, 2016). Quimicamente, a definição de betalaína compreende a toda substância com estrutura baseada na fórmula geral mostrada na Figura 2. Portanto, são derivados do íon imínio conjugado com o ácido betalâmico (STRACK *et al.*, 2003).

Figura 2 - Estrutura geral das betalaínas. R₁ e R₂ = grupos alquilas ou arilas.

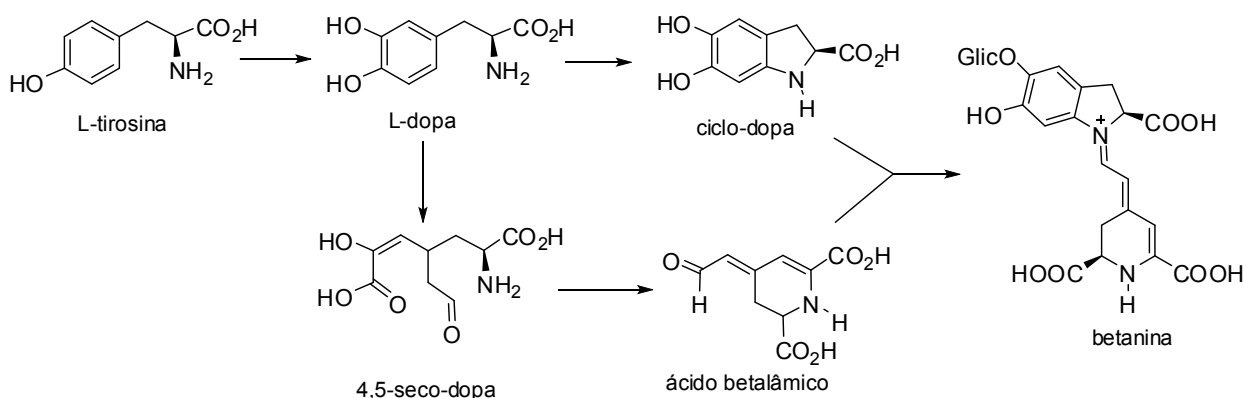


Fonte: Adaptado de Strack *et al.*, 2003.

Segundo Drunkler *et al.* (2006), a estrutura geral das betalaínas contém o ácido betalâmico acompanhado de um radical R₁ ou R₂. Estes radicais são uma representação geral para os possíveis substituintes desse ponto da estrutura, que podem ser de um simples hidrogênio a um complexo substituinte. A variação desses grupos é em função das diferentes fontes de onde podem ser obtidos esses pigmentos e determinam sua tonalidade e estabilidade.

A via de biossíntese das betalaínas inicia com a conversão de *L*-tirosina em *L*-3,4-dihidroxifenilalanina (*L*-dopa) por uma hidroxilação enzimática (Figura 3). Em seguida, duas enzimas chaves CYP76AD1 e DODA (4,5-dioxigenase) catalisam a conversão de *L*-dopa para ciclo-dopa e ácido betalâmico.

Figura 3 - Proposta de biossíntese da betanina.

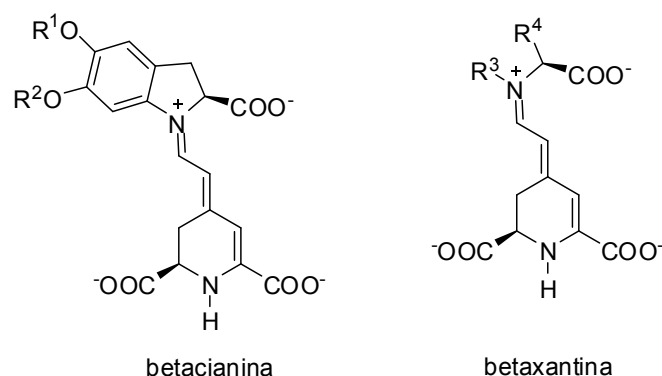


Fonte: Autora

O acoplamento entre o ácido betalâmico e a ciclo-dopa ocorre espontaneamente e origina a betanidina, aglicona de todas as betacianinas (Figura 4) (GONÇALVES *et al.*, 2012). Experimentos com *L*-tirosina marcada [^{14}C , ^{15}N] demonstraram que os carbonos e os nitrogênios marcados estavam incorporados nas moléculas do ácido betalâmico e do ciclo-dopa (LIEBISCH *et al.*, 1969), indicando que para formação de uma molécula de betacianina são necessárias duas moléculas de tirosina (GONÇALVES *et al.*, 2012).

O ácido betalâmico pode conjugar com aminoácidos e aminas para produzir betaxantinas ou cicliza automaticamente com ciclo-dopa para dar betacianinas. Na literatura há a descrição de mais de 50 betalaínas e todas têm a mesma estrutura básica (Figura 4). Betaxantinas e betacianinas podem ser classificadas em várias subclasses com base nas características químicas do ácido betalâmico conjugado. Betanina, amarantina, gonferina e bougainvilina são exemplos de algumas dessas subclasses (TANAKA *et al.*, 2008).

Figura 4 - Estrutura geral das betacianinas vermelhas (R^1 = Glicosídeo; R^2 = H) e das betaxantinas amarelas (R^3 = H ou alquil e R^4 resíduos de aminoácidos).



Fonte: Gonçalves *et al.*, 2012.

Estes pigmentos naturais são encontrados nas plantas da maioria das famílias da ordem Caryophyllales (com a exceção de Caryophyllaceae e Moluginaceae), e em frutos de cacto (WYBRANIEC *et al.*, 2007), em grãos de quinoa (*Chenopodium quinoa*) (ESCRIBANO *et al.*, 2017), flores das espécies da família Amaranthaceae (RUB *et al.*, 2016), flores de *Celosia* (SPÓRNA-KUCAB *et al.*, 2018), em pitaia rosa (THIRUGNANASAMBANDHAM *et al.*, 2017) e acelga de talo (STINTZING e CARLE, 2008). Betalaínas também estão presentes em alguns fungos tal como *Amanita muscaria* (CEJUDO-BASTANTE *et al.*, 2014).

Para ampliar a gama de cores de betalaínas de modo a viabilizar a sua aplicação comercial, plantas da família Cactaceae têm sido exploradas, em especial os frutos de opuntia e pitaia (STINTZING e CARLE, 2007). Nestes frutos é possível obter betalaínas com coloração entre o amarelo-laranja e o vermelho-violeta, dependendo das concentrações de betacianinas e betaxantinas presentes (MOSSHAMMER *et al.*, 2005).

O interesse nas cores de Caryophyllales suculentas levou à descoberta das Betalaínas (MABRY *et al.*, 2001). Entretanto, a principal fonte natural destes pigmentos é a raiz da beterraba vermelha, que contém cerca de 100 mg de betanina/100 g de tubérculo (GONÇALVES *et al.*, 2012). Em proporções, as betalaínas representam cerca de 1% da base seca a partir do material fresco (HERBACH *et al.*, 2004).

3.2.1 Betanina

A betanina (CI Natural Red 33, E-number E162, betanidina 5-O- β -glucosídeo) (Figura 3) é um pigmento vermelho dinâmico principalmente responsável pela cor característica da

beterraba. Ele é usado na indústria alimentícia como aditivo alimentar (HELYES *et al.*, 2003) e o seu pigmento de coloração intensa, apresenta maior poder tintorial que alguns corantes sintéticos (CONSTANT *et al.*, 2002), a beterraba, apresenta a concentração de 300 a 600 mg kg⁻¹ (GHASEMPOUR *et al.*, 2019).

Betanina pode ser usada como um poderoso antioxidante na indústria alimentícia em extrato ou em pó, e também é aplicada como pigmento natural. Sua atividade antioxidante em ambientes lipídicos biológicos foi demonstrada em macromoléculas humanas, tais como lipoproteínas de baixa densidade, membranas e células inteiras (KHAN *et al.*, 2015).

3.3 Solventes Eutéticos Profundos (SEP)

Em um futuro próximo, os solventes convencionais deverão ser substituídos por solventes projetados para obedecer aos 12 princípios da Química Verde, introduzidos por Anastas e Warner (ANASTAS & WARNER 1998).

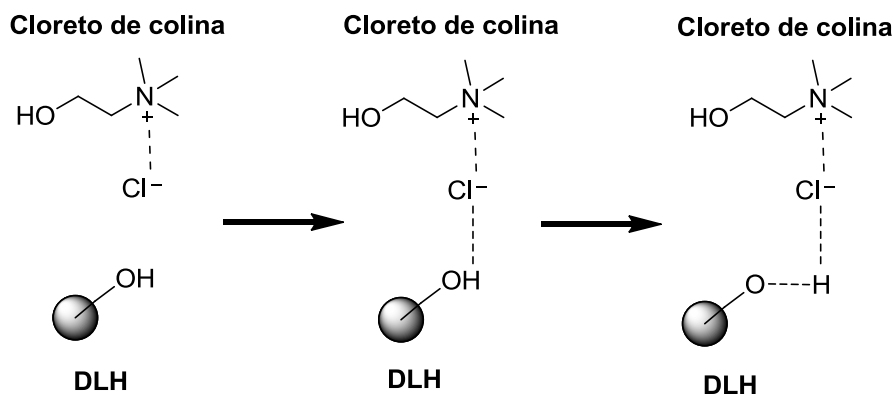
Em 2003, foi desenvolvido um novo tipo de solvente, os chamados solventes eutéticos profundos (SEPs) (ABBOTT *et al.*, 2003). Nas últimas décadas, os SEPs foram expandindo devido a sua popularidade, como alternativas promissoras aos solventes orgânicos (JIANG *et al.*, 2019).

Os SEPs estão sendo usados desde 2004 juntamente com alguns sais, principalmente sais de amônio quaternário, especialmente o cloreto de colina, que são sólidos à temperatura ambiente. Este sal de amônio precisa ser combinado com um ou mais compostos sólidos à temperatura ambiente com propriedades específicas para produzir um líquido em temperatura ambiente para uso como solvente (FLORINDO *et al.*, 2019).

O SEP é um tipo de solvente em que a temperatura ambiente possui temperatura de fusão mais baixa do que qualquer um dos componentes individuais da mistura (ALANÓN *et al.*, 2018). Atualmente, este princípio está sendo ampliado para a criação de solventes projetados, usando várias combinações de receptor de ligação de hidrogênio (RLH) e doador de ligação de hidrogênio (DLH), com propriedades compatíveis para dissolver e extrair metabólitos secundários de origem vegetal e animal (VIEIRA *et al.*, 2018).

Então, os SEPs são definidos como mistura de um receptor de ligação de hidrogênio (RLH) e um doador de ligação de hidrogênio (DLH), unidos por fortes ligações intermoleculares quando em determinada razão molar e temperatura (RUESGAS-RAMON *et al.*, 2017). A figura 5 esquematiza as interações na formação destas ligações.

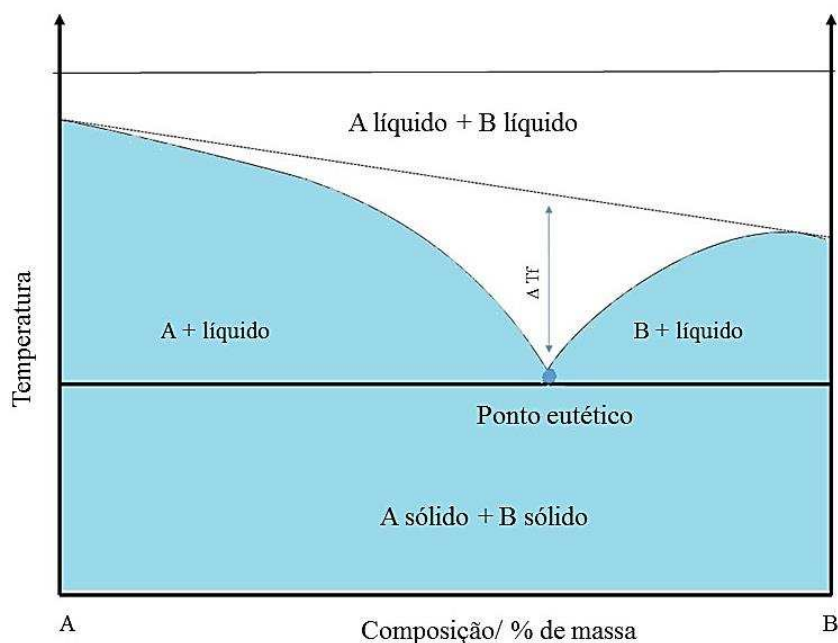
Figura 5 - Exemplo das interações na formação de um solvente eutético profundo.



Fonte: Adaptado de Shekaari *et al.*, 2018.

Estas interações físicas induzem uma diminuição drasticamente na temperatura de fusão da mistura (Figura 6), em oposição à temperatura de fusão dos componentes puros, através da estabilização da composição líquida, induzindo a formação de uma fase líquida à temperatura ambiente (OSCH *et al.*, 2019). Segundo Abbot *et al.* (2014), esta redução na temperatura de transição sólido-líquido característica dos SEPs é resultado da formação de ligações de hidrogênio entre os compostos presentes no sistema.

Figura 6 - Representação esquemática do ponto eutético de um diagrama de fases de dois componentes.



Fonte: Adaptado de Costa, 2016.

Os solventes eutéticos profundos naturais têm propriedades físico-químicas, como viscosidade ajustável, baixa volatilidade, biodegradabilidade, alta estabilidade térmica, solubilidade em água e alta capacidade de solubilização para vários compostos polares e não-polares como metabolitos pouco solúveis ou insolúveis em água, bem como macromoléculas, como proteínas e polissacarídeos (SAVI *et al.*, 2019). Além disso, os SEPs exibem muitas outras vantagens, como fácil preparação, não são inflamáveis e toxicidade farmacológica aceitável (LI *et al.*, 2016). O preparo dos SEPs possui uma economia de átomos de 100%, é fácil de manusear e não necessita de purificação, fazendo com que sua utilização possa ser de larga escala (COSTA, 2016).

São solventes que apresentam alta eficiência e seletividade em meios de extração em comparação com solventes orgânicos (RUESGAS-RAMON *et al.*, 2017), como fácil isolamento de produtos naturais, reciclagem de catalisadores, preços acessíveis e potencial para realizar reações que não possuem bom desempenho em solventes orgânicos tradicionais (TAKADA *et al.*, 2006).

Estudos relatam importantes aplicações de SEP na indústria alimentícia, farmacêutica, bem como na petroquímica como alternativa para a purificação do biodiesel, pois minimiza a geração de poluentes e resíduos tóxicos (ABBOTT *et al.*, 2014; BI *et al.*, 2013).

Este tipo de solvente foi testado para a extração de ácidos graxos voláteis e biomoléculas, como cafeína e vanilina, de um ambiente aquático (RIBEIRO *et al.*, 2015). Estudos de Osch e colaboradores (2019) verificaram que os SEPs foram capazes de remover rifoblavina (vitamina B2) de soluções aquosas. Pal & Jadeja (2019) extraíram polifenóis da cebola (*Allium cepa* L.) usando diferentes SEPs.

Há um número crescente de estudos de extração de uma variedade de matrizes alimentares usando SEPs de compostos biologicamente ativos em folhas de *Olea europaea* (ATHANASIADIS *et al.*, 2018), borras de vinho (BOSILJKOV *et al.*, 2017), cebola, azeitona, subprodutos de tomate e pera industrial (FERNANDEZ *et al.*, 2018), grãos de café (AHMAD *et al.*, 2018), palha de arroz (KUMAR *et al.*, 2018) e torta de azeitona (CHANIOTI & TZIA, 2018).

Eles também são quimicamente adaptáveis, isto é, suas propriedades físico-químicas podem ser afinadas alterando suas composições, com uma escolha de componentes e proporções molares, temperatura e teor de água visando adequar as suas propriedades físico-químicas (SAVI *et al.*, 2019).

3.4 Metodologia de superfície de resposta (MSR)

A metodologia de superfície de respostas (MSR) é uma técnica estatística útil para desenvolver, melhorar e otimizar processos (LIYANA-PATHIRANA & SHAHIDI, 2005). Dentre as diversas técnicas multivariadas de otimização, esta metodologia vem sendo muito aplicada por causa de sua alta eficiência, poder de modelagem e capacidade de exploração dos sistemas estudados (NOVAES *et al.*, 2017).

A MSR pode ser entendida como uma combinação de técnicas de planejamento de experimentos, análise de regressão e métodos de otimização e se baseia no ajuste de modelos matemáticos empíricos aos dados experimentais obtidos segundo uma determinada matriz experimental com o objetivo de descrever o comportamento destes dados e fazer previsões estatisticamente válidas (HANRAHAN *et al.*, 2006). Têm sido utilizadas com sucesso na otimização da extração de pigmentos naturais de beterraba de diferentes fontes (MARAN & PRIYA, 2016)

Portanto, a MSR é utilizada para avaliar e elucidar as relações entre as respostas e os efeitos das variáveis dentro de uma região ótima.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

As beterrabas *in natura* (*Beta vulgaris*) foram adquiridas em feira de produtos orgânicos, em Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

4.2 Preparação do material vegetal

Inicialmente, as beterrabas *in natura* (100 g) foram higienizadas e trituradas utilizando o processador de alimentos (Phillips-Walita). Posteriormente, o material foi submetido ao processo de liofilização. O material vegetal seco foi macerado até a formação de um pó fino que foi acondicionado em frascos de plástico em dessecador a temperatura ambiente.

4.3 Preparo dos solventes eutéticos profundos (SEPs)

Para este estudo escolheu-se preparar três solventes eutéticos profundos em meio ácido, neutro e básico. Utilizou-se a combinação de cloreto de colina como RLH e ácido cítrico, glicerol e ureia para DLH. A síntese dos SEPs baseou-se na metodologia descrita por (ZHAO *et al.*, 2015). Inicialmente, em um béquer pesou-se o cloreto de colina e em seguida o DLH, segundo as razões molares previamente estabelecidas (Tabela 1). Com o auxílio de um bastão de vidro foi feita a homogeneização dos reagentes. A mistura foi colocada em um banho de glicerina previamente estabilizado em 70 °C. A rotação do banho foi fixada em 300 rpm. A mistura eutética foi mantida no banho sob agitação magnética até a formação de um líquido transparente e homogêneo. Por fim, o SEP foi retirado do banho, armazenado em um frasco âmbar e acomodado em um dessecador.

Tabela 1 - Proporções para o preparo dos SEPs.

Solvente eutético profundo	Equivalente molar RLH:DLH	Referência
Cloreto de colina: ácido cítrico (ChCl:Ac)	1:2	Abbott <i>et al.</i> , 2004
Cloreto de colina: glicerol (ChCl:G)	1:2	Smith <i>et al.</i> , 2014
Cloreto de colina: ureia (ChCl:U)	1:2	Smith <i>et al.</i> , 2014

4.4 Espectroscopia no Infravermelho

As análises de espectroscopia no infravermelho foram realizadas em espectrofotômetro FT-IR VARIAN 660 equipado com GladiATR.

4.5 Extrações com diferentes solventes, ácidos e bases

Foram também realizadas extrações de betanina da beterraba utilizando-se diversos solventes, com distintos valores de pH: como: água, metanol, etanol, etanol/ água (1:1), bicarbonato de sódio 1 M, ácido acético 0,5%, ChCl:Ac / água (4:1), ChCl:G/ água (4:1) e ChCl:U/ água (4:1).

Em tubos de ensaio, pesaram-se 0,1 g de beterraba liofilizada e 5 g de solvente extrator e para as extrações com os SEPs, pesaram-se 1 g do mesmo e 4 g de água Milli-Q. Os tubos de ensaio foram submersos em um banho ultrassônico com temperatura controlada em 35 °C, frequência de 37 kHz, amplitude de 100 %W e com tempo de 38 minutos. Posteriormente, filtraram-se estes extratos por meio de filtração a vácuo.

Em seguida, foi retirada uma alíquota de 100 µL dos extratos de cada ensaio e adicionado 9900 µL de água deionizada, resultando em um volume total de 10 mL de amostra. Destas amostras, foram retiradas 30 µL para análise em CLAE-UV. As quantificações destes extratos foram avaliadas pela curva analítica (Figura 8).

4.6 Planejamento experimental

A otimização da extração foi realizada por meio da metodologia de superfície de resposta. Foi utilizado um planejamento composto central com dois fatores, constituído de quatro ensaios fatoriais obtidos da combinação dos níveis +1 e -1, cinco repetições no ponto central denotado pelos níveis (0,0) e quatro ensaios nos pontos axiais obtidos das combinações dos níveis $(\pm \sqrt{2}, 0)$ e $(0, \pm \sqrt{2})$, tendo como as variáveis independentes o tempo (X_1 ; min) e a proporção de solvente eutético profundo em água (X_2 ; %: v/v). Os níveis estudados para cada variável estão apresentados na Tabela 2.

As respostas medidas (variável dependente) foram expressas em mg de betanina presente em 100 g de beterraba liofilizada (mg/100 g). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* Statistica (versão 7.0, StartSoft, Inc.).

Modelos estatísticos foram ajustados, gerando equações polinomiais de segunda ordem. A função de respostas (Y) foi dividida nos componentes linear, quadrático e de interação (Equação 2).

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_{11} + b_{22}x_{22} + b_{12}x_1x_2 \quad (2)$$

em que: b_0 é o coeficiente constante, b_1 e b_2 são os coeficientes lineares, b_{11} e b_{22} são os coeficientes quadráticos e b_{12} é o coeficiente de interação, x representa as variáveis ou fatores independentes e Y representa a variável dependente ou resposta.

Os coeficientes de regressão foram obtidos utilizando regressão linear múltipla (MLR), pelo método dos mínimos quadrados. Tais coeficientes foram avaliados estatisticamente quanto a sua significância e interpretados de acordo com sua importância no sistema.

A análise de variância (ANOVA) foi usada para verificar a validade dos modelos ajustados. Os gráficos de superfície de resposta foram obtidos usando os valores estimados pelos modelos ajustados.

O teste F para a falta de ajuste também foi levado em consideração na avaliação dos modelos ajustados. O Teste t de Student foi utilizado para testar a significância dos coeficientes da regressão. Todos os cálculos foram realizados usando o software Statistica 7.0.

Tabela 2 - Planejamento experimental para a otimização da extração de betanina em beterraba em função do tempo e a proporção de solvente eutético profundo em água.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis originais	
	X1	X2	t (min)	Conc. (%)
1	-1	-1	16	10
2	+1	-1	60	10
3	-1	+1	16	30
4	+1	+1	60	30
5	$-\sqrt{2}$	0	7	20
6	$+\sqrt{2}$	0	69	20
7	0	$-\sqrt{2}$	38	6
8	0	$+\sqrt{2}$	38	44
9	0	0	38	20
10	0	0	38	20
11	0	0	38	20
12	0	0	38	20
13	0	0	38	20

X1 = variável tempo (min.); X2 = variável concentração do solvente (%)

4.7 Extratos de beterraba para o planejamento experimental

Para o preparo dos extratos de beterraba com SEPs, foram pesadas em tubo de ensaio, 0,1 g de beterraba liofilizada em pó fino, água e solvente extrator SEP (cloreto de colina: ácido cítrico, cloreto de colina: glicerol e cloreto de colina: ureia) variando as quantidades de água, SEP e tempo de extração (Tabela 2). Os extratos foram submersos em um banho ultrassônico com temperatura controlada em 35 °C, frequência de 37 kHz e amplitude de 100 %W. Posteriormente, os extratos foram filtrados. Foram retirados 20 µL de cada extrato para análise em CLAE-UV. As eficiências destas extrações foram avaliadas pela curva analítica (Figura 8).

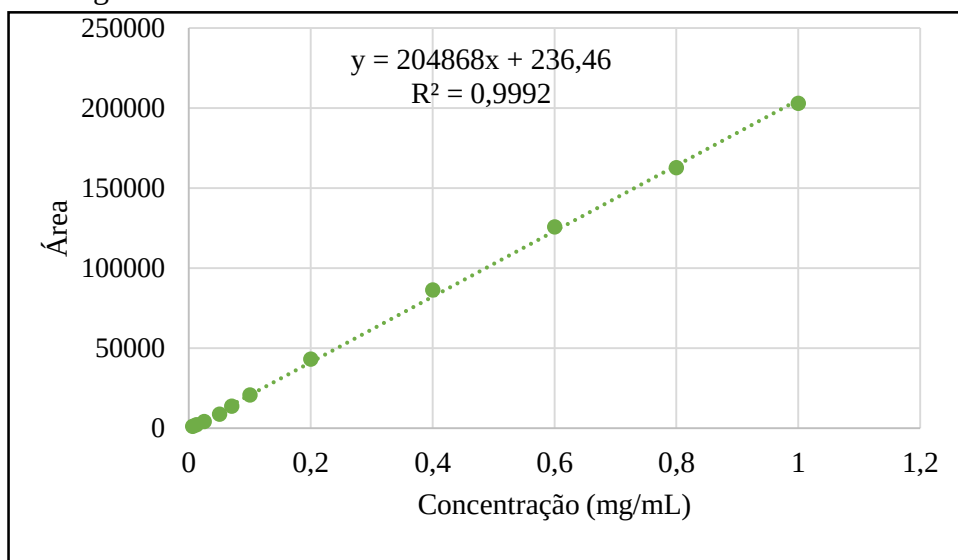
4.8 Quantificação de betanina

Os extratos foram analisados em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) para quantificação de betanina, utilizando o cromatógrafo líquido da marca Shimadzu modelo LC10AD. A eluição foi realizada através de gradiente entre duas fases móveis: Fase A: água com 0,5% (v/v) de ácido acético e Fase B: 40% v/v de acetonitrila/ água com 0,5% (v/v) de

ácido acético. A análise foi realizada com gradiente linear 5% a 95% de B durante 40 minutos, taxa de fluxo: 1 mL min⁻¹ e temperatura aproximadamente de 23 °C. O volume de amostra utilizado foi 20 µL. As amostras foram monitoradas por UV-Vis de absorção em 536 nm. Para a quantificação de betanina utilizou-se uma curva padrão externa a partir da injeção do padrão em diferentes concentrações.

Para a curva analítica utilizou-se o padrão (Sigma-Aldrich) de betanina. A curva analítica foi preparada a partir de sucessivas diluições da solução estoque de 1,0 mg mL⁻¹. As concentrações utilizadas para construção da curva foram 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05; 0,0125 e 0,00625 mg mL⁻¹ (Figura 7). Para a quantificação de betanina obteve-se a equação da reta $y = 204868x + 236,46$ e coeficiente de correlação $R^2 = 0,9992$.

Figura 7 - Curva analítica obtida por CLAE-UV para betanina na faixa de concentração entre 1,0 a 0,00625 mg mL⁻¹.



4.9 Atividade antioxidante

4.9.1 Poder redutor

Para avaliação do poder de redução dos extratos de beterraba, seguiu-se a metodologia sugerida por Yen & Chen (1995). As amostras dos extratos foram diluídas, obtendo-se as seguintes concentrações: 0,312; 0,625; 1,25; 2,5 e 5,0 mg mL⁻¹ e transferida uma alíquota de 1,0 mL de cada amostra, para tubos de ensaio de 25 mL. A estas alíquotas foram adicionados: 2,5 mL de tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ (pH 6,6) e 2,5 mL de ferrocianeto de potássio (K₃[Fe(CN)₆]) a 1% (m/v). A mistura foi incubada a 45 °C por 20 minutos. Foram adicionados 2,5 mL de ácido tricloroacético a 10% (m/v) à solução no tubo de ensaio, com posterior

agitação. Um volume de 2,5 mL da mistura foi transferido para outro tubo de ensaio, no qual foram adicionados 2,5 mL de água Milli-Q e 0,5 mL de cloreto de ferro (III) (FeCl_3) a 0,1% (m/v), sob agitação. A leitura da absorbância foi realizada a 700 nm. As leituras foram realizadas em triplicata e neste teste utilizou-se como 100% de atividade a absorbância do padrão de 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) nas concentrações referidas para as amostras (0,312; 0,625; 1,25; 2,5 e 5,0 mg mL^{-1}).

4.9.2 Poder sequestrante de radicais livres DPPH

A atividade sequestrante de radicais livres (ASRL) DPPH dos extratos de beterraba foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Hatano e colaboradores (1988) com modificações. Cada amostra foi diluída em etanol a 0,312; 0,625; 1,25; 2,5 e 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em 4 mL da amostra adicionou-se 1 mL de (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil) 0,5 mmol L^{-1} (DPPH) igualmente diluído em etanol. A mistura foi acondicionada em tubo de ensaio âmbar e agitada. Decorridos 30 minutos, foi feita a leitura a 517 nm de absorbância. Os testes foram realizados em triplicata. A atividade sequestrante de radical livre (% ASRL) foi expressa em porcentagem (Equação 3):

$$\% \text{ ASRL} = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100 \quad (3)$$

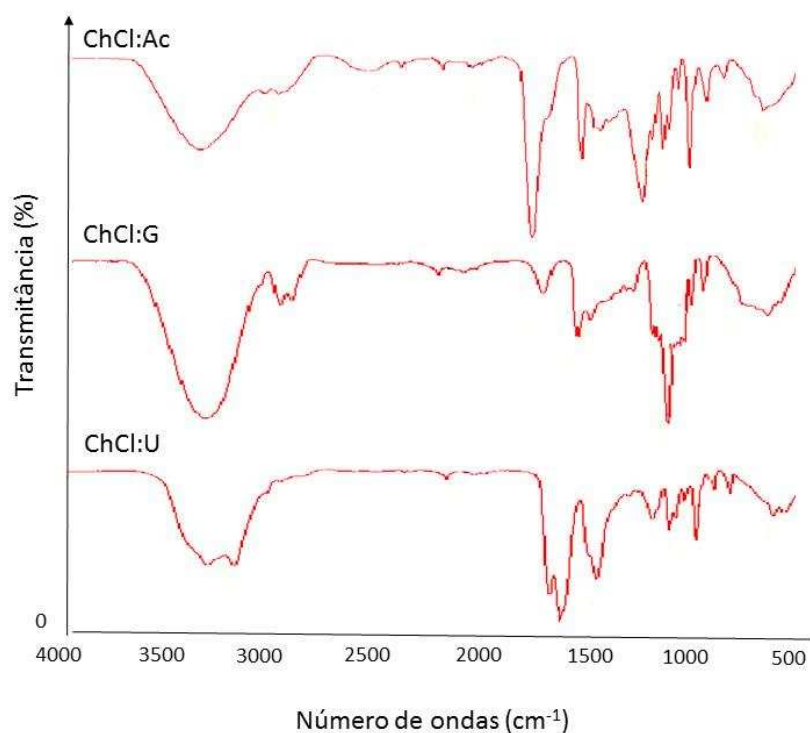
Em que, A_c : absorbância do controle; A_t : absorbância da amostra.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perfil espectrométrico dos SEPs preparados

A preparação dos três SEPs foi caracterizada pela análise de seu espectro no infravermelho (Figura 8). Neste espectro foram observadas as bandas amplas e fortes na região de 3350 e 3030 cm^{-1} , as quais foram atribuídas ao estiramento das ligações OH corroborando com os dados obtidos no estudo de Abo-hamad e colaboradores (2015), o qual indicou a presença de muitas ligações de hidrogênio nos três SEPs preparados.

Figura 8 - Espectro no Infravermelho dos três diferentes SEPs.



5.2 Teor de betanina em extrações com diferentes solventes, ácidos e bases

Na Tabela 3, estão apresentados os valores da concentração de betanina em mg/100 g de beterraba liofilizada, obtidos em CLAE-UV, assim como os respectivos valores de pH dos extratos obtidos por distintos solventes extratores.

Tabela 3 - Teor de betanina mg/100 g em beterraba obtida por solventes, ácidos e bases.

Extrator	Betanina (mg/100 g)	pH dos extratos
Água	144,90	5,0
Metanol	4,60	4,8
Etanol	3,00	6,1
Etanol/água (4:1)	141,20	6,7
Bicarbonato de sódio 1 M	56,14	8,3
Ácido acético 0,5%	80,60	3,9
ChCl:Ac/ água (4:1)	111,93	4,5
ChCl:G/ água (4:1)	82,47	5,7
ChCl:U/ água (4:1)	60,75	7,8

Com o auxílio da curva analítica (Figura 7), obteve-se as concentrações da mistura de betanina e isobetanina, extraídas da beterraba liofilizada (*Beta vulgaris*).

A estabilidade da betanina depende do meio. A acidez/basicidade do meio compromete a estabilidade do pigmento. Geralmente as soluções vermelhas contendo betanina são relativamente estáveis de pH 3 a 7 (SHIOZER & BARATA, 2007). Observa-se que a água é o melhor solvente extrator devido sua alta polaridade, como afirma Stintzing (2008) que as betalaínas são solúveis em água. As betacianinas precipitam em meio ácido, e resultam nas betaxantinas (DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000), como pode-se observar que a extração executada com solventes ácidos, foram mais eficientes em comparação aos solventes com característica neutras.

Ferreira *et al.* (2017), encontrou em seu trabalho a concentração de 88,08 mg de betanina em 100 g de beterraba, extraída com água. Assim como, Melo (2014) encontrou na casca da pitaya da espécie *Hylocereus polyrhizus* (pitaya roxa) uma concentração de 101,04 mg de equivalentes à betanina /100 g de amostra seca.

Observa-se, que ao adicionar água ao etanol, a polaridade é modificada, aumentado, assim, a concentração de betanina extraída, pode-se observar que a eficiência aumentou de 3 mg para 141,20 mg/100 g de beterraba.

Nos extratos obtidos com os SEPs, o ChCl:Ac/água (4:1) apresentou maior concentração de betanina, devido ao pH da solução extratora, a qual estabilizou o composto, já o SEP ChCl:G/água (4:1), apresentou valores próximos. O SEP ChCl:U/água (4:1), extraiu em menor quantidade em comparação com os outros SEPs, devido ao meio alcalino da solução extratora que ocasionou a degradação da betanina.

5.3 Perfil de betalaínas

A análise da composição de betalaínas em beterraba liofilizada extraída pelos solventes eutéticos profundos, ChCl:Ac, ChCl:G e ChCl:U, foi realizada por CLAE-UV e estão apresentados nos cromatogramas (Figuras 9, 10 e 11). O primeiro pico é característico do composto betanina e o segundo do seu isômero isobetanina com tempos de retenção de 9,9 e 11,3 minutos, respectivamente. Ambos os sinais foram comparados com o tempo de retenção obtido pelo padrão de betanina.

A análise cromatográfica dos extratos com os SEPs por CLAE-UV sugere que, os solventes utilizados para a extração foram seletivos para a mistura de betanina e isobetanina,

no comprimento de onda de 536 nm. Haja vista que, há somente dois picos cromatográficos majoritários.

Porém, o extrato com água, possui maior quantidade de betanina e isobetanina extraída, assim como outros compostos extraídos. Para este extrato, utilizou-se uma concentração de extrato de partida menor, utilizou-se 50 μmL de extrato solubilizados em 9950 μmL , pois as áreas dos picos obtidas por CLAE foram atenuadas, se discrepando dos demais cromatogramas.

A detecção em 536 nm mostra que, a quantidade de betanina e isobetanina extraída é maior com o SEPs de ácido cítrico, seguido do SEPs de glicerol e por último o SEPs de ureia, provavelmente devido ao pH dos solventes eutéticos profundos para efetuar as extrações.

Figura 9 - Cromatograma da composição de betalaínas em beterraba extraída com água em área x tempo (min).

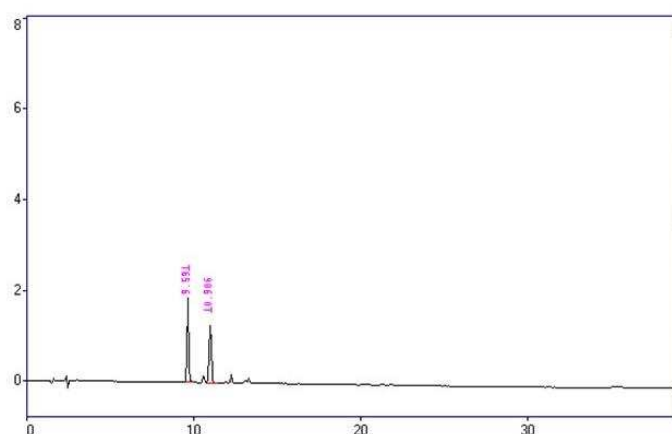


Figura 10 - Cromatograma da composição de betalaínas em beterraba extraída com $\text{ChCl}:\text{Ac}$ em área x tempo (min).

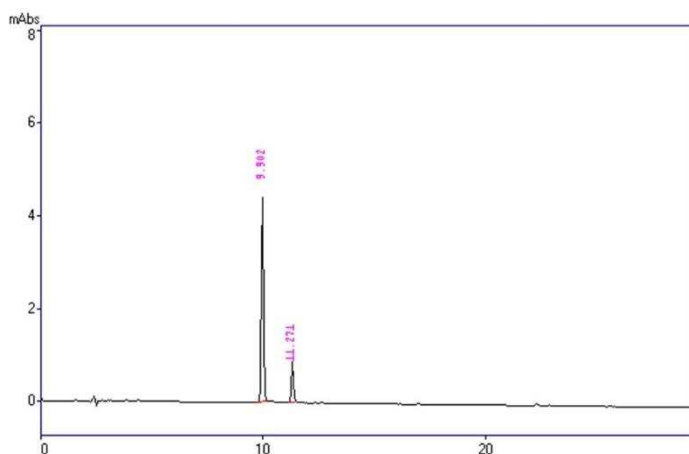


Figura 11 - Cromatograma da composição de betalaínas em beterraba extraída com ChCl:G em área x tempo (min).

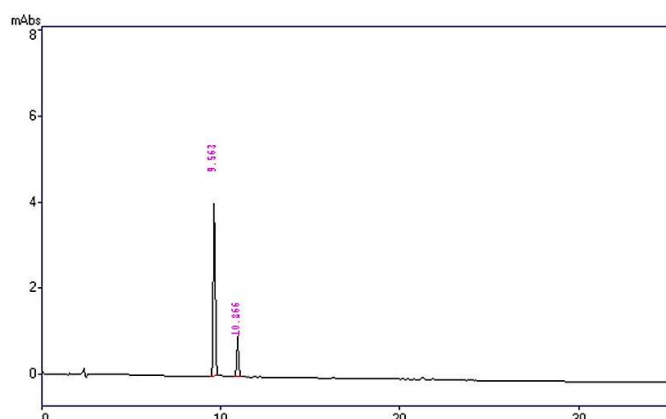
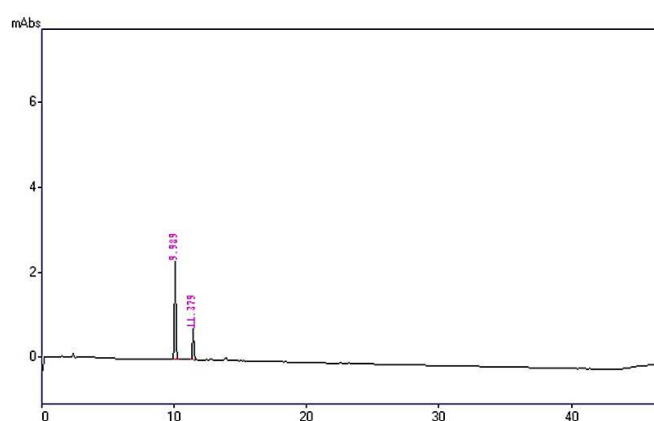


Figura 12 - Cromatograma da composição de betalaínas em beterraba extraída com ChCl:U em área x tempo (min)



5.4 Otimização da extração de betanina

As respostas obtidas dos 13 ensaios para os solventes eutéticos ChCl:Ac, ChCl:G e ChCl:U, respectivamente, estão mostradas na Tabela 4. O teor de betanina está expresso em mg/100 g.

Tabela 4 - Respostas obtidas de betanina (mg/ 100 g) nos 13 ensaios do planejamento estatístico.

Ensaio	Variáveis originais		Solventes eutéticos profundos		
	X1	X2	ChCl:Ac	ChCl:G	ChCl:U
1	16	10	80,0165	96,9900	41,8497
2	60	10	51,6885	90,7285	52,4980
3	16	30	72,7217	94,0990	55,8707
4	60	30	88,3680	104,4570	67,5197
5	7	20	105,7090	90,4320	59,8952
6	69	20	50,0670	102,2627	62,1407
7	38	6	61,5890	82,9310	51,1177
8	38	44	111,9337	82,4685	60,7507
9	38	20	86,6600	92,1857	50,5845
10	38	20	89,0640	92,9007	43,1112
11	38	20	87,7595	92,8555	41,2797
12	38	20	90,9567	91,6255	42,4475
13	38	20	88,4372	93,6635	42,3987

X1 = variável tempo (min.); X2 = variável concentração do solvente (%)

Para as extrações com ChCl:Ac, observa-se que a maior concentração obtida foi de 111,9337 mg/100 g no tempo de 38 minutos e com a maior porcentagem de solvente de 44% e a menor concentração obtida foi de 50,0670 mg/100 g, não havendo relação com a menor porcentagem de solvente utilizado. Porém, o tempo em contato com o banho ultrassônico foi maior, neste caso de 69 min. Para as extrações com ChCl:G, as maiores concentrações foram de 104,4570 e 102,2627 mg/100 g, ambas com os maiores tempos de extração, assim como para os ensaios com ChCl:U que, obteve também, as maiores concentrações com os maiores tempos de extração.

5.4.1 Cloreto de colina: ácido cítrico

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, o teor de antocianinas nos extratos de cloreto de colina: ácido cítrico variou de 50,0670 a 111,9337 mg/100 g na beterraba liofilizada.

O planejamento (Tabela 2) e os dados experimentais obtidos (Tabela 3) foram usados para calcular os coeficientes das equações polinomiais de segunda ordem. A Tabela 5 sumariza os coeficientes de regressão, bem como sua significância.

Tabela 5 - Coeficientes de regressão para o modelo construído para as variáveis de resposta de tempo e proporção de solvente de betanina extraída com cloreto de colina: ácido cítrico.

	Coeficientes	Erro	Teste t	p	-95%	+95%
b₀	92,25932	2,001714	46,0902	0,000001	86,70167	97,81697
b₁	-0,41693	0,109381	-3,8117	0,018913	-0,72062	-0,11324
b₂	-30890	0,010273	-2,8432	0,000786	-0,4843	-0,01177
b₁₁	-0,01435	0,001270	-11,3024	0,000349	-0,01788	-0,01083
b₂₂	-0,01633	0,002291	-7,1283	0,002048	-0,02270	-0,00997
b₁₂	0,04941	0,002874	17,1941	0,000067	0,04143	0,05739

b₀ média ou interseção, b₁ tempo, b₂ proporção de solvente

Pode-se observar pelos dados da Tabela 4, que a variável tempo apresentou efeito linear negativo ($p < 0,05$) indicando que um aumento no nível desta variável causa um decréscimo na resposta.

Os coeficientes b₁ e b₁₁ referentes à variável tempo e os coeficientes b₂ e b₂₂ referentes à variável proporção de solvente eutético profundo em água apresentam sinal negativo. Isto significa que os efeitos destas variáveis quando analisados isoladamente contribuem para uma diminuição na resposta, mas o coeficiente b₁₂ apresenta sinal positivo, ou seja, quando as variáveis atuam em conjunto o efeito será o aumento da resposta, isto é, da extração de betanina.

O coeficiente de regressão da variável linear da concentração b₂, apresenta-se como uma variável significativa, pois aumentando-se a concentração, não haveria um aumento significativo na resposta. Entretanto, para este coeficiente quadrático b₂₂, observa-se que um aumento demasiado na concentração, haveria uma redução na resposta, quando analisado isoladamente, pois apresenta valor negativo.

Estes resultados sugerem que, quando ocorre um aumento ou diminuição demasiados, dentro dos níveis estudados da concentração da solução extratora, ocorre uma queda quadrática destas respostas.

Após a análise dos coeficientes, os modelos propostos foram avaliados quanto a seu ajuste e a análise de variância (ANOVA) para os modelos (Tabela 5).

A falta de ajuste foi significativa, o que pode ser explicado pelo valor baixo do SQ Erro puro.

Pode-se observar pelos dados da Tabela 6, que a falta de ajuste foi não significativa para o tempo ($p>0,05$) e para a concentração de solvente ($p>0,05$).

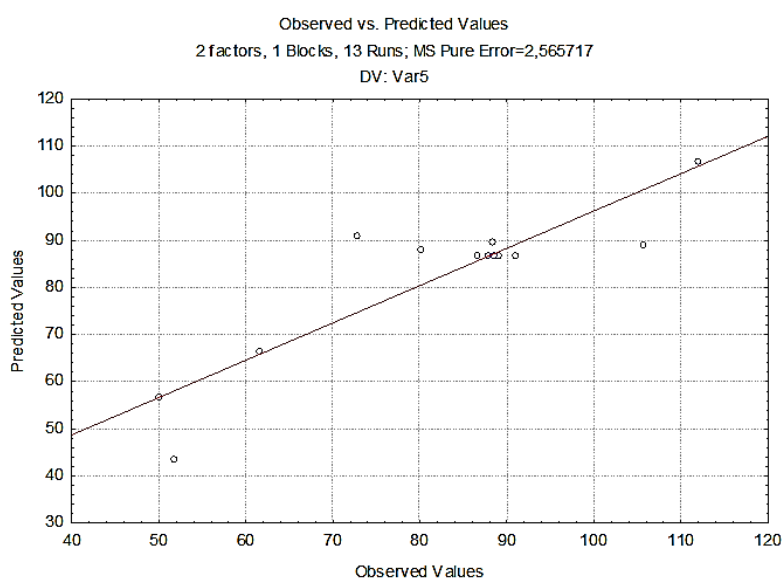
Tabela 6 - Análise de variância dos dados experimentais para betanina extraída com cloreto de colina: ácido cítrico.

	SQ	GL	F	p
X1 (L)	1040,854	1	405,6774	0,000036
X1 (Q)	247,795	1	96,5793	0,000601
X2 (L)	176,986	1	76,8321	0,005421
X2 (Q)	193,722	1	75,5039	0,000966
X1. X2	483,435	1	188,4209	0,000163
Falta de ajuste	2071,608	4	201,8547	0,000073
Erro puro	10,263	4	-	-
Total	4170,194	12	-	-

SQ: Soma dos Quadrados; GL: Graus de Liberdade; F: Teste de Fisher

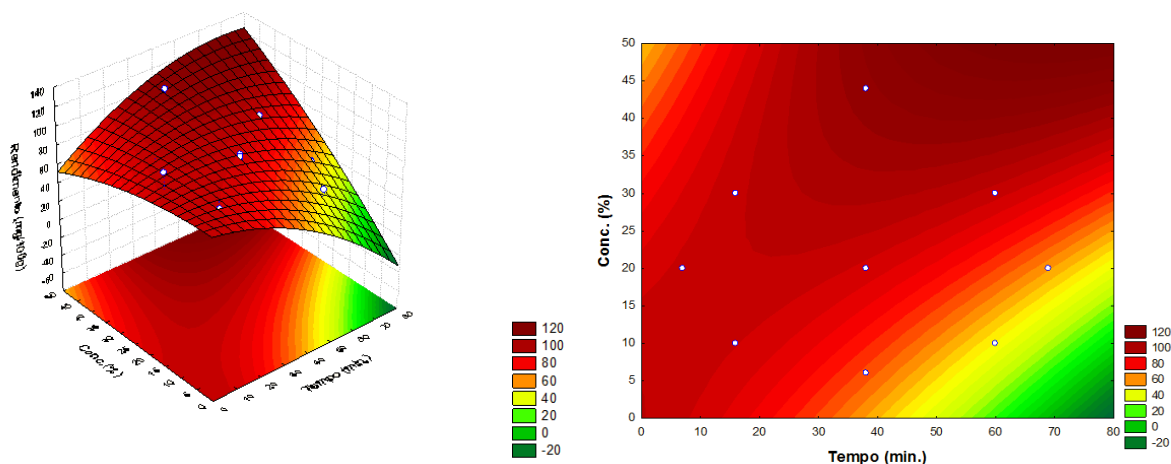
Pelo gráfico de valores observados e preditos (Figura 13) pode-se observar a relação das variáveis tempo e concentração, as quais apresentam boa correlação, apesar de possuir pontos discrepantes.

Figura 13 - Valores observados e preditos dos dados experimentais para betanina extraída com cloreto de colina: ácido cítrico.



O gráfico da concentração *versus* tempo (Figura 14) mostra os contornos das respostas, obtidos por meio dos valores preditos dos modelos ajustados, onde pode-se observar o efeito da interação entre as variáveis juntamente com rendimento.

Figura 14 - Contorno das respostas para betanina extraída com cloreto de colina: ácido cítrico.



Em relação ao teor de betanina/isobetanina verificou-se que o ponto ótimo foi obtido ao utilizar a proporção de solvente de 45% e tempo variando de 40 a 60 minutos, obtendo-se uma concentração de 111, 193 mg/100 g.

5.4.2 Cloreto de colina:glicerol

No planejamento composto central realizado para as extrações com cloreto de colina: glicerol, observou-se, pela Tabela 4, que o teor de betanina dos extratos variou de 23,37 a 63,06 mg/100 g de beterraba.

Na tabela 7, são apresentados os coeficientes estimados para o modelo quadrático, sendo todos significativos a 5% de probabilidade. Observa-se que b_1 apresenta valor negativo, isto significa que para um aumento no tempo obedecendo os limites do planejamento, ocorre em média um decréscimo na resposta, já o coeficiente quadrático b_{11} é positivo significando que para valores muito alto de tempo (fora dos limites do planejamento) poderia haver aumento na resposta. O coeficiente b_2 apresenta valor positivo, o que pode ser explicado pelo aumento na resposta para pequeno aumento no nível da variável proporção de solvente eutético profundo, já o coeficiente b_{22} é negativo, isto significa que para maiores níveis de proporção de solvente

o efeito é a redução da extração de betanina. Ambos os casos só são válidos quando analisarmos as variáveis separadamente, pois o coeficiente b_{12} que representa a interação entre as duas variáveis tem valor positivo, o que denota um aumento na extração quando se aumenta simultaneamente os níveis das duas variáveis. Tudo isso pode ser observado no gráfico da superfície de resposta (Figura 15).

Tabela 7 - Coeficientes de regressão para o modelo construído para as variáveis de resposta de tempo e proporção de solvente de betanina extraída com cloreto de colina: glicerol.

	Coeficientes	Erro	Teste t	p	-95%	+95%
b₀	96,87843	1,921748	50,4116	0,000001	91,54281	102,2141
b₁	-0,74330	0,060163	-12,3549	0,000247	-0,91034	-0,5763
b₂	0,00637	0,000621	10,2589	0,000509	0,00464	0,0081
b₁₁	0,57388	0,108907	5,2695	0,006214	0,27151	0,8763
b₂₂	-0,02621	0,001708	-15,3436	0,000105	-0,03095	-0,0215
b₁₂	0,01889	0,001759	10,7337	0,000427	0,01400	0,0238

b_0 média ou interseção, b_1 tempo, b_2 proporção de solvente

Após a análise dos coeficientes, os modelos propostos foram avaliados quanto a seu ajuste, e a Tabela 8 apresenta a análise de variância (ANOVA) para os modelos.

Pode-se observar, pela Tabela 8, que a falta de ajuste foi significativa para o tempo ($p > 0,05$) e para a concentração de solvente ($p > 0,05$).

Ao analisar a interação entre a variável tempo e proporção de solvente, nota-se que há o efeito sinérgico, pois, o coeficiente $X_1.X_2$ possui um valor positivo, o qual obtém-se um aumento na resposta, como pode ser visto na figura 16, quando se aumenta ambas as variáveis, obtém-se valores de respostas maiores.

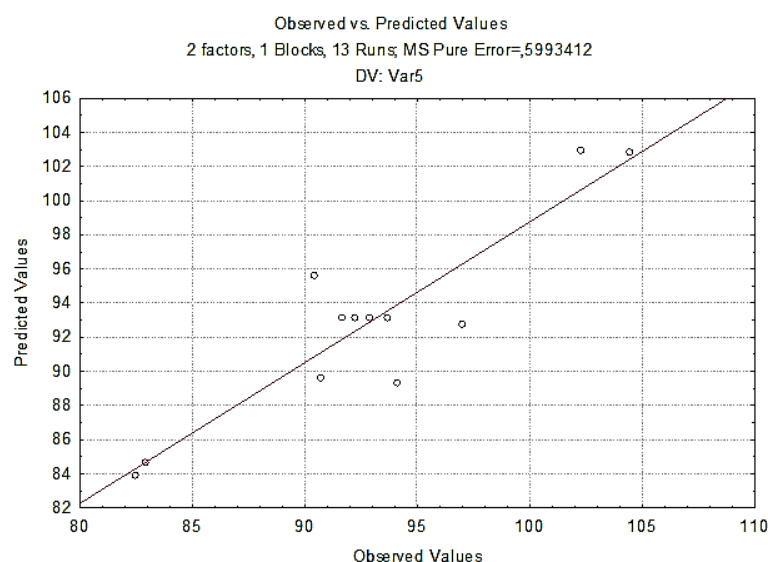
Tabela 8 - Análise de variância dos dados experimentais para betanina extraída com cloreto de colina: glicerol.

	SQ	GL	F	p
X1 (L)	54,1043	1	90,2730	0,000685
X1 (Q)	63,0780	1	105,2456	0,000509
X2 (L)	48,6082	1	81,1027	0,000842
X2 (Q)	141,1007	1	235,4263	0,000105
X1. X2	69,0519	1	115,2131	0,000427
Falta de ajuste	78,5401	3	43,6813	0,001629
Erro puro	2,3974	4	-	-
Total	461,1124	12	-	-

SQ: Soma dos Quadrados; GL: Graus de Liberdade; F: Teste de Fisher

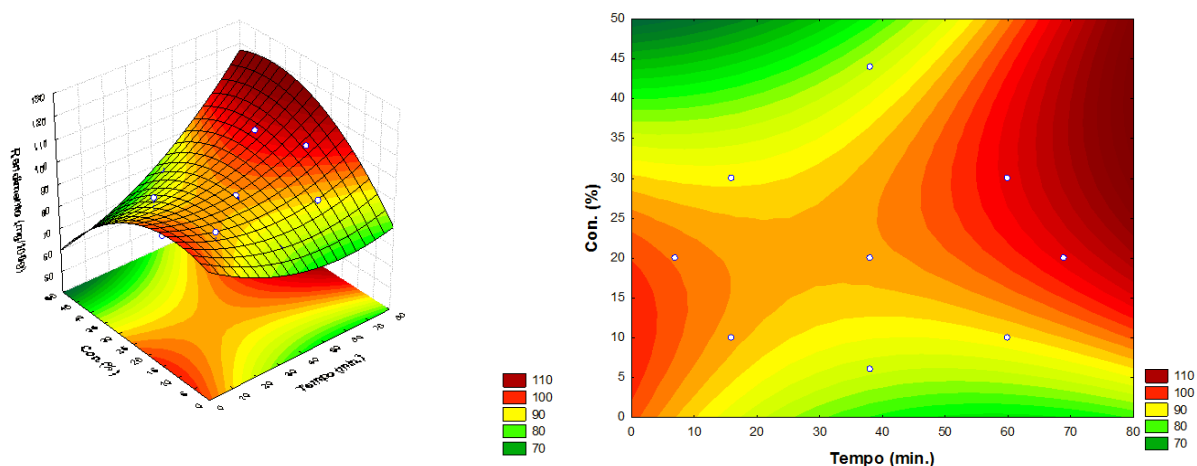
O gráfico de valores observados e preditos (Figura 15) observa-se a relação de tempo e concentração, pode-se perceber uma boa correlação, apesar de possuir pontos discrepantes.

Figura 15 - Valores observados e preditos dos dados experimentais para betanina extraída com cloreto de colina: glicerol.



O gráfico da concentração *versus* tempo (Figura 16) mostra os contornos das respostas, obtidos por meio dos valores preditos dos modelos ajustados, onde pode-se observar o efeito da interação entre as variáveis juntamente com rendimento.

Figura 16 - Contorno das respostas para betanina extraída com cloreto de colina:glicerol.



Em relação ao teor de betanina/isobetanina verificou-se que a melhor condição foi obtida ao utilizar a proporção de solvente na concentração entre 20 e 44% e tempo próximos de 69 minutos, obtendo-se concentrações de 100 a 110 mg/100 g.

5.4.3 Cloreto de colina: ureia

De acordo com a Tabela 4, o teor de antocianinas nos extratos com cloreto de colina: ureia variou de 41,2797 a 67,5197 mg/100 g na beterraba liofilizada.

De acordo com os resultados obtidos (tabela 9), a variável tempo quando analisada isoladamente, observa-se que causa um decréscimo na resposta, o que pode ser confirmado pelos valores negativos de b_1 e b_{11} .

O coeficiente de regressão da variável linear da proporção de solvente b_2 , é significativa, no entanto um aumento na concentração isoladamente não causa um aumento significativo na extração. Deve-se analisar os efeitos quadráticos e de interação das variáveis, pois possuem valores positivos, em outras palavras, se a concentração fosse elevada juntamente com aumento do tempo, se conseguiria alcançar, possivelmente, maiores concentrações de betanina extraídas.

Estes resultados sugerem que, quando ocorre um aumento ou diminuição demasiados, dentro dos níveis estudados da concentração da solução extratora, ocorre uma queda quadrática destas respostas.

Porém, o mais apreciável é a interação sinérgica entre as variáveis, que causa um aumento na resposta.

Tabela 9 - Coeficientes de regressão para o modelo construído para as variáveis de resposta de tempo e proporção de solvente de betanina extraída com cloreto de colina: ureia.

	Coeficientes	Erro	Teste t	p	-95%	+95%
b₀	136,0635	9,330525	14,58262	0,000129	110,1578	161,9692
b₁	-2,7059	0,292104	-9,26360	0,000755	-3,5169	-1,8949
b₂	0,0223	0,003014	7,38297	0,001794	0,0139	0,0306
b₁₁	-3,6191	0,528768	-6,84444	0,002384	-5,0872	-2,1510
b₂₂	0,0406	0,008292	4,89578	0,008068	0,0176	0,0636
b₁₂	0,0466	0,008543	5,45398	0,005492	0,0229	0,0703

b₀ média ou interseção, b₁ tempo, b₂ proporção de solvente

Pode-se observar, pela Tabela 10, que a falta de ajuste foi significativa, embora com valor de F pequeno.

Ao analisar a interação entre a variável tempo e proporção de solvente, nota-se que há o efeito sinérgico, pois, o coeficiente X1.X2 é positivo, o qual obtém-se um aumento na resposta como pode ser visto na figura 16, quando aumentado ambas as variáveis, obtém-se valores de respostas maiores.

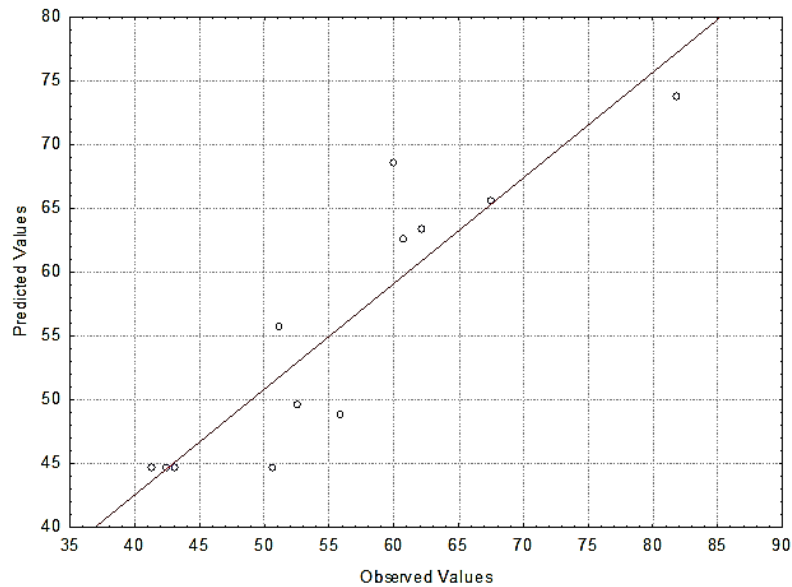
Tabela 10 - Análise de variância dos dados experimentais para betanina extraída com cloreto de colina: ureia.

	SQ	GL	F	P
X1 (L)	26,517	1	1,87688	0,242553
X1 (Q)	770,116	1	54,50826	0,001794
X2 (L)	41,469	1	2,93512	0,161829
X2 (Q)	338,640	1	23,96868	0,008068
X1. X2	420,263	1	29,74595	0,005492
Falta de ajuste	231,254	3	5,45601	0,067391
Erro puro	56,514	4	-	-
Total	1672,246	12	-	-

SQ: Soma dos Quadrados; GL: Graus de Liberdade; F: Teste de Fisher

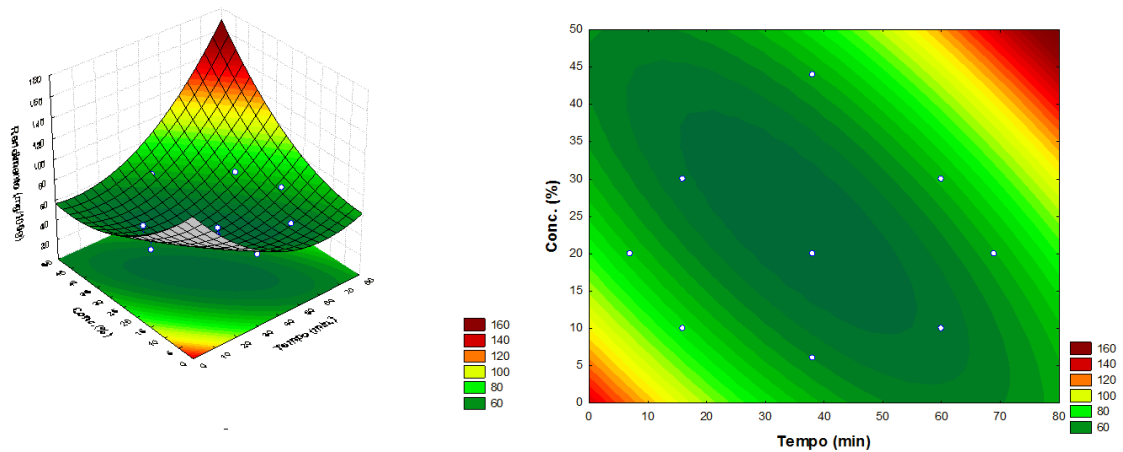
O gráfico de valores observados e preditos (Figura 17) observa-se a relação de tempo e concentração, pode-se perceber uma boa correlação, apesar de possuir pontos discrepantes.

Figura 17 - Valores observados e preditos dos dados experimentais para betanina extraída com cloreto de colina: ureia.



O gráfico da concentração *versus* tempo (Figura 18) mostra os contornos das respostas, obtidos por meio dos valores preditos dos modelos ajustados, onde pode-se observar o efeito da interação entre as variáveis juntamente com rendimento.

Figura 18 - Contorno das respostas para betanina extraída com cloreto de colina: ureia.



No gráfico da imagem 18, pode-se observar que a região do ponto central é a região de menores valores. Pode-se observar que os melhores valores são os pontos em torno do tempo 16 min e concentração 10% e, também, em torno do tempo 60 min e concentração 30%, em torno destas faixas obteve-se os valores otimizados da extração de betanina utilizando o solvente eutético cloreto de colina: ureia.

Observou-se que o tempo de 7 minutos e na proporção de solvente de 20%, o SEP-ácido cítrico foi o solvente com melhor resposta, pois obteve maior resposta no menor tempo de extração estudado, obtendo 105,7090 mg/100 g de betanina. Portanto, considera-se que este solvente se apresentou como melhor solvente na otimização de extração de betanina de beterraba liofilizada.

5.5 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos de beterraba foi realizada por dois métodos *in vitro*, devido a importância de avaliar o comportamento desses extratos por mecanismo de ação diferentes, e assim obter resultados mais confiáveis. Na Tabela 11 estão apresentados os resultados do poder de redução do padrão de betanina, do extrato etanol, metanol, bicarbonato de sódio 1 M, etanol/água (1:1), ChCl:Ac/água (4:1), ChCl:U /água (4:1), ácido acético, água e ChCl:G/água (4:1). Na tabela 12, podem ser observados os resultados da atividade antioxidante dos referidos extratos frente ao radical de DPPH.

Os extratos com solventes eutéticos profundos apresentaram as maiores atividades antioxidantes em todas as concentrações avaliadas. O poder redutor utilizando os extratos com o SEP foi maior que o poder redutor utilizando solventes convencionais, como o etanol e metanol. Dentre os SEPs, o SEP glicerol apresentou a melhor atividade antioxidante, já o SEP-ureia e ácido cítrico apresentaram valores próximos de poder redutor do padrão. O maior poder redutor foi observado no extrato com SEP-glicerol em todas as concentrações testadas. Este resultado corrobora com os resultados obtidos na maior concentração de betanina extraída com este solvente. No entanto, a atividade antioxidante pode estar relacionada com outros compostos presentes na beterraba.

Dentre os solventes convencionais, a maior atividade antioxidante foi observada com o solvente metanol, já utilizando etanol/água (1:1) o valor encontrado foi maior que o resultado com o solvente metanol e etanol. O extrato etanol apresentou o menor poder redutor que todos os extratos testados. Este resultado, também já era esperado, devido a baixa concentração de betanina extraída com este solvente. Entretanto, esperava-se que o extrato obtido com água obtivesse maiores resultados na atividade antioxidante, mas, o extrato obtido com SEP-glicerol apresentou as maiores atividades antioxidantes, estes resultados sugerem que os solventes eutéticos profundos promovem o efeito sinérgico juntamente com os compostos da beterraba,

promovendo maiores valores na atividade antioxidante em relação aos extratos obtidos com água.

Com relação ao padrão betanina, esse apresentou uma atividade antioxidante de 55,04% de poder redutor na concentração de $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Essa atividade antioxidante foi maior que a atividade antioxidante dos extratos com etanol e metanol.

Já os outros extratos apresentaram uma atividade antioxidante maior com essa concentração de extrato de beterraba. O resultado da atividade antioxidante dos extratos frente ao DPPH também mostrou o potencial antioxidante nos extratos com SEP.

Nos resultados da atividade antioxidante foi observada uma maior atividade antioxidante no SEP glicerol nos dois métodos avaliados. Diferentes porcentagens de atividade antioxidante nos dois métodos testados foram observadas (Tabelas 11 e 12). Isto já era esperado, pois os métodos apresentam mecanismos de ação diferentes. O DPPH avalia a transferência de átomos de hidrogênio pelas espécies antioxidantes para estabilizar os radicais livres, enquanto o ensaio do poder de redução monitora o potencial de doação de elétrons pelas espécies antioxidantes. A determinação do poder redutor está relacionada com a capacidade de reduzir o íon Fe^{3+} para Fe^{2+} .

Estes resultados da atividade antioxidante encontrados nos extratos de beterraba são respaldados pelos obtidos por outros estudos avaliando a atividade antioxidante e outras propriedades biológicas, devido aos benefícios dos antioxidantes naturais a saúde humana.

Tabela 11 - Valores da avaliação da atividade antioxidante dos extratos de beterraba frente ao poder redutor.

Concentração (mg mL ⁻¹)	Padrão Betanina	Etanol	Metanol	Bicarbonato De sódio	Poder redutor (%)					Água	ChCl:G/ água (4:1)
					Etanol/ água (1:1)	ChCl:Ac/ água (4:1)	ChCl:U/ água (4:1)	Ácido acético			
5,0	55,04	42,76	51,75	58,34	60,73	61,48	63,13	79,90	83,94	85,89	
2,5	52,35	40, 52	46,81	55,94	58,93	58,79	59,98	76,75	81,70	83,34	
1,25	51,15	38,27	44,86	53,39	57,59	56,54	56,54	70,32	80,20	81,25	
0,625	49,05	36,47	42,76	51,75	55,79	53,99	53,69	67,92	78,25	79,60	
0,312	47,55	33,48	35,72	49,35	54,14	51,75	51,00	65,37	76,16	77,95	

Tabela 12 - Valores da avaliação da atividade antioxidante dos extratos de beterraba frente ao DPPH.

Concentração (mg mL ⁻¹)	Padrão Betanina	Etanol	Metanol	Bicarbonato De sódio	Atividade antioxidante (%)					
					Etanol/ água (1:1)	ChCl:Ac/ água (4:1)	ChCl:U/ água (4:1)	Ácido acético	Água	ChCl:G/ água (4:1)
5,0	55,65	53,09	60,76	61,94	74,79	78,81	79,30	85,54	87,16	88,05
2,5	51,67	49,50	55,99	59,68	64,06	75,57	76,25	83,43	80,53	84,51
1,25	49,06	46,60	55,40	56,04	57,12	65,93	63,86	65,78	68,04	71,97
0,625	46,50	45,13	51,08	55,56	51,27	64,45	62,24	63,12	59,29	68,14
0,312	45,72	42,92	49,50	52,45	49,01	57,72	60,17	56,19	56,58	63,86

O coeficiente de correlação de Pearson para betanina em DPPH teve o $r = 0,9381$ e com o poder redutor de $r = 0,8101$. O maior coeficiente de correlação foi o da betanina frente ao DPPH, mostrando uma correlação muito forte ($0,8 < r < 1$), de acordo com os conceitos da correlação de Pearson.

Já para a correlação de Pearson para betanina no poder redutor ($r = 0,8101$) foi uma correlação considerada forte. Este método de avaliação de atividade antioxidante baseia-se no mecanismo de ação por transferência de elétrons e o método por DPPH se avalia a transferência de prótons visto que na estrutura da betanina estão presentes hidroxilas que favorecem este tipo de atividade antioxidante.

Estes resultados mostram a influência da betanina na atividade antioxidante em ambos os métodos. No entanto, é possível que a atividade do potencial antioxidante apresentada não seja somente devido à betanina, mas pode estar relacionada com o sinergismo de outros compostos presentes nos extratos da beterraba utilizados no presente estudo.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho e os objetivos propostos, conclui-se que é possível utilizar solventes alternativos no processo de extração de betanina de beterraba (*Beta vulgaris*).

Diante das extrações realizadas utilizando diferentes solventes, foi possível observar, que pelo fato da betalaína ser um composto hidrossolúvel, a extração com SEP-ácido cítrico apresentou uma boa extração, a presença de outros compostos além da água altera as condições modificando, a concentração do composto extraído. Dessa forma, os solventes utilizados no presente trabalho são uma opção viável para a extração de compostos.

De modo geral, os solventes alternativos investigados para a extração de betanina da beterraba, mostram-se potencialmente promissores para a substituição de solventes convencionais.

REFERÊNCIAS

1. ABO-HAMAD, A.; HAYYAN, M.; ALSAADI, M. A.; HASHIM, M. A. Potential applications of deep eutectic solvents in nanotechnology, **Chemical Engineering Journal**, v. 273, n. 1, p. 551-567, 2015.
2. ABBOTT, A. P.; SMITH, E. L.; RYDER, K. S. Deep eutectic solvents (DES) and their applications. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 21, p. 11060-11082, 2014.
3. ABBOTT, A. P.; CAPPER, G.; DAVIES, D. L.; RASHEED, R. Ionic liquids based upon metal halide/substituted quaternary ammonium salt mixtures. **Inorganic Chemistry**, v. 43, n. 11, p. 3447-3452, 2004.
4. ABBOTT, A. P.; CAPPER, G.; DAVIES, D. L.; RASHEED, R. K.; TAMBYRAJAH, V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. **Chemical Communications**, v. 1, p. 70-71, 2003.
5. ALAÑÓN, M. E.; IVANOVIC, M.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; Segura-Carretero, A. Choline chloride derivative-based deep eutectic liquids as novel green alternative solvents for extraction of phenolic compounds from olive leaf. **Arabian Journal of Chemistry**, p. 1878-5352, 2018.
6. ALVES, C. B.; MONTEIRO, L. B.; POMPEU, D. R. Otimização da extração sólido-líquido de compostos fenólicos totais e betalaínas da casca de frutos de pitaya (*Hylocereus polyrhizus*). **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 12, n. 1, p. 2556-2577, 2018.
7. AHMAD, I.; PERTIWI, A. S.; KEMBAREN, Y. H.; RAHMAN, A.; MUNIM, A. Application of natural deep eutectic solvent-based ultrasonic assisted extraction of total polyphenolic and caffeine content from coffee beans (*Coffea beans* L.) for Instant Food Products. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 8, n. 8, p. 138-143, 2018.
8. AMNAH, M. A. A. Nutritional, sensory and biological study of biscuits fortified with red beet roots. **Life Science Journal**, v. 10, p.1579-1584, 2013.
9. ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. Green Chemistry-Theory and practice. New York: Oxford University Press, 1998.
10. ANDREW, C.; ETIM, E. E.; USHIE, O. A.; JOB, J. N. Deep Eutectic Solvents: An Overview of its Application as a “Green” Extractant. **International Journal of Advanced Research in Chemical Science (IJARCS)**, v. 4, p. 23-30, 2017.
11. ATHANASIADIS, V.; GRIGORAKIS, S.; LALAS, S.; MAKRIS, D. P. Highly efficient extraction of antioxidant polyphenols from *Olea europaea* leaves using an eco-friendly glycerol/glycine deep eutectic solvent. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, p. 1985-1992, 2018.
12. BAJKACZ, S.; ADAMEK, J. Development of a method based on natural deep eutectic solvents for extraction of flavonoids from food samples. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 5, p. 1330-1344, 2017.

13. BOSILJKOV, T.; DUJMIC, F.; CVJETKO, B. M.; HRIBAR, J.; VIDRIHB, R.; BRNCI, M.; ZLATIC, E.; RADOJCI, R. I.; JOKIC, S. Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. **Food and Bioproducts Processing**, v. 102, p. 195-203, 2017.
14. BELLEBNA, Y.; BERMMAKI, H.; SEMMAK, A. Experimental design for enhancement of betanin in beet juice using pulsed electric field. **Agricultural Food Engineering**, v. 9, n. 58, p. 71-80, 2016.
15. BI, W.; TIAN, M.; ROW, K. H.; Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. **Journal of Chromatography A**, v. 1285, p. 22-30, 2013.
16. BORKOWSKI, T.; SZYMUSIAK, H.; SWIGLO, A. G.; RIETJENS, I. M. C. M.; TYRAKOWSKA, B. Radical scavenging capacity of wine anthocyanins is strongly pH dependent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5526-5534, 2005.
17. CAO, J.; CHEN, L.; LI, M.; CAO, F.; ZHAO, L.; SU, E. Two-phase systems developed with hydrophilic and hydrophobic deep eutectic solvents for simultaneously extracting various bioactive compounds with different polarities. **Green Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 1879-1886, 2018.
18. CARDOSO-UGARTE, G. A.; SOSA-MORALES, M. E.; BALLARD, T.; LICEAGA, A.; GONZÁLEZ, M. F. Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*). **LWT-Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 276-282, 2014.
19. CHANIOTI, S.; TZIA, C. Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 48, p. 228-239, 2018.
20. CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes alimentícios. **Boletim Centro De Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba-PR, v. 20, p. 203-220, 2002.
21. CEJUDO-BASTANTE, M. J.; CHAALAL, M.; LOUAILECHE, H.; PARRADO, J.; HEREDIA, F. J. Betalain profile phenolic content, and color characterization of different parts and varieties of *Opuntia ficus indica*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 33, p. 8491-8499, 2014.
22. CLIFFORD, T.; CONSTANTINOU, C. M.; KEANE, K. M.; WEST, D. J.; HOWATSON, G.; STEVENSON, E. J. The plasma bioavailability of nitrate and betanin from *Beta vulgaris rubra* in humans. **European Journal of Nutrition**, v. 56, n. 3, p. 1245-1254, 2016.
23. CLIFFORD, T.; HOWATSON, G.; WEST, D. J.; STEVENSON, E. J. The potential benefits of red beetroot supplementation in health and disease. **Nutrients**, v. 7, n. 4, p. 2801-2822, 2015.
24. CORRALES, M.; TOEPFL, S.; BUTZ, P.; KNORR, D.; TAUSCHER, B. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or

- pulsed electric fields: a comparison. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 1, p. 85-91, 2008.
25. COSTA, F. C. A. **Estudo das propriedades termofísicas dos solventes eutéticos e desenvolvimento de novas membranas sustentáveis para a separação de CO₂**. 2016. Dissertação (Mestrado em engenharia química e bioquímica) - Faculdade de ciência e tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 2016.
 26. DAI, Y.; SPRONSEN, J. V.; WITKAMP, G. J.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. **Analytica Chimica acta**, v. 766, p. 61-68, 2013.
 27. DRUNKLER, D. A.; FETT, R.; BORDIGNON, M. T. **Avaliação da estabilidade de betalainas em extrato de beterraba (*Beta vulgaris* L.) com α -, β - e γ - ciclodextrinas**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Departamento de ciências agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina UFSC, Florianópolis, SC, 2006.
 28. ESCRIBANO, J.; CABANES, J.; JIMÉNEZ-ATIÉNZAR, M.; IBAÑEZ-TREMOLADA, M.; GÓMEZ-PANDO, L. R.; GARCÍA-CARMONA, F.; GANDÍA-HERRERO, F. Characterization of betalains, saponins and antioxidant power in differently colored quinoa (*Chenopodium quinoa*) varieties. **Food Chemistry**, v. 234, p. 285-294, 2017.
 29. FERNANDEZ, M. A.; ESPINO, M.; GOMEZ, F. J. V.; SILVA, M. F. Novel approaches mediated by tailor-made green solvents for the extraction of phenolic compounds from agro-food industrial by products. **Food Chemistry**, v. 239, p. 671-678, 2018.
 30. FERREIRA, L. P. C.; XAVIER, A. C. R.; SANTOS, J.; WARTHA, E. R. S. A.; PAGANI, A. A. C. Estudo de Diferentes Metodologias para Quantificação de Betalaína de Beterraba. 3º **Congresso Internacional de Atividade Física, Nutrição e Saúde**, v. 1, p. 14-19, 2017.
 31. FLORINDO, C.; LIMA, F.; RIBEIRO, B. D.; MARRUCHO, I. M. Deep eutectic solvents: overcoming 21st century challenges. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 8, p. 31-36, 2019.
 32. GANDÍA-HERRERO, F.; ESCRIBANO, J.; GARCÍA-CARMONA, F. Biological activities of plant pigments betalains. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 6, p. 937-945, 2016.
 33. GANDÍA-HERRERO, F.; GARCÍA-CARMONA, F. Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 6, p. 334-343, 2013.
 34. GHASEMPOUR, Z.; KHALED-ABAD, M. A.; VARDAST, M. R.; BARI, M. R.; KIA, E. M. Fabrication of betanin imprinted polymer for rapid detection of red beet adulteration in pomegranate juice. **Polymer Bulletin**, v. 76, p. 1793-1805, 2019.
 35. GENGATHARAN, A.; DYKES, G. A.; CHOO, W. S. Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. **LWT-Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 645-649, 2015.

36. GONÇALVES, L. C. P.; TONELLI, R. R.; BAGNARESI, P.; MORTARA, R. A.; FERREIRA, A. G.; BASTOS, E. L. A Nature-Inspired Betalainic Probe for Live Cell Imaging of Plasmodium-Infected Erythrocytes. **Plos One**, v. 8, n. 1, p. e53874, 2013.
37. GONÇALVES, L. C. P.; TRASSI, M. A. D. S.; LOPES, N. B.; DORR, F. A.; SANTOS, M. T.; BAADER, W. J.; OLIVEIRA, V. X.; BASTOS, E. L. A comparative study of the purification of betanin. **Food Chemistry**, v. 131, n. 1, p. 231-238, 2012.
38. HATANO, T.; KAGAWA, H.; YASUHARA, T.; OKUDA, T. Two new flavonoids and other constituents in licorice roots: their relative astringency and radical scavenging effects. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 6, p. 2090-2097, 1988.
39. HARLEV, E.; NEVO, E.; SOLOWEY, E.; BISHAYEE, A. Cancer Preventive and Curative Attributes of Plants of the Cactaceae Family: A Review. **Planta Medica**, v.79, p. 713-722, 2013.
40. HELYES, L.; PÉK, Z.; BRANDT, S. Influence of harvest date on fruit technological trails of five processing tomato varieties. In: **ISHS Acta Horticulturae: VIII International symposium on the processing tomato**, v. 613, p. 213-216, 2003.
41. HERBACH, K. M.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. Betalain stability and degradation - structural and chromatic aspects. **Journal Food Science**, v. 71, n. 4, p. 41-50, 2006.
42. HERBACH, K.; STINTZING, F.; CARLE, R. Impact of thermal treatment on colour and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. **Journal Food Science**, v. 69, n. 6, p. 491-498, 2004.
43. IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2017: resultados preliminares**. Rio de janeiro, RJ: IBGE. 2018. 108p.
44. JIANG, Z. M.; WANG, L. J.; GAO, Z.; ZHUANG, B.; YIN, Q.; LIU, E. H. Green and efficient extraction of different types of bioactive alkaloids using deep eutectic solvents. **Microchemical Journal**, v. 145, p. 345-353, 2019.
45. KHAN, M. I. Plant betalain: Safety, antioxidant activity, clinical efficacy, and bioavailability. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 2, p. 316-330, 2015.
46. KUMAR, S.; BROOKS, M. S. L. Use of Red Beet (*Beta vulgaris* L.) for antimicrobial applications-A Critical Review. **Food Bioprocess Technology**, v. 11, p. 17- 42, 2018.
47. KUMAR, A. K.; SHAH, E.; PATEL, A.; SHARMA, S.; DIXIT, G. Physico-chemical characterization and evaluation of neat and aqueous mixtures of choline chloride + lactic acid for lignocellulosic biomass fractionation, enzymatic hydrolysis and fermentation. **Journal of Molecular Liquids**, v. 271, p. 540-549, 2018.
48. LI, X.; ROW, K. H. Development of deep eutectic solvents applied in extraction and Separation. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 18, p. 183-153, 2016.

49. LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 93, n. 1, p. 47-56, 2005.
50. MABRY, T. J.; DREIDING, A. S. The betalaines. **Recent Advances in Phytochemistry**, v. 1, 1968.
51. MARAN, J. P. & PRIYA, B. Multivariate statistical analysis and optimization of ultrasound-assisted extraction of natural pigments from waste red beet stalks. **Journal Food Scientists & Technologists**, v. 53, n. 1, p. 792-799, 2016.
52. MIKOLAJCZYK-BATOR, K.; CZAPSKI, J. Effect of pH changes on antioxidant capacity and the content of betalain pigments during the heating of a solution of red beet betalains. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 67, n. 2, p. 123-128, 2017.
53. MONTENEGRO, C. F.; KWONG, D. A.; MINOW, Z. A.; DAVIS, B. A.; LOZADA, C. F.; CASAZZA, G. A. Betalain-rich concentrate supplementation improves exercise performance and recovery in competitive triathletes. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 42, n. 2, p. 166-172, 2017.
54. NOVAES, C. G.; YAMAKI, R. T.; PAULA, V. F.; JÚNIOR, B. B. N.; BARRETO, J. A.; VALASQUES, G. S.; BEZERRA, M. A. Otimização de métodos analíticos usando metodologia de superfícies de resposta - Parte I: variáveis de processo. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1184-1215, 2017.
55. PAL, C. B. T.; JADEJA, C. G. Deep eutectic solvent-based extraction of polyphenolic antioxidants from onion (*Allium cepa* L.) peel. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 4, p. 1969-1979, 2019.
56. PENA-PEREIRA, F.; NAMIESNIK, J. Ionic Liquids and Deep Eutectic Mixtures: sustainable Solvents for Extraction Processes. **ChemSusChem**, v. 7, n. 7, p. 1784-1800, 2014.
57. POLTURAK G.; AHARONI, A. “La Vie en Rose”: Biosynthesis, sources, and applications of betalain pigments. **Molecular Plant**, v. 11, n. 1, p. 7-22, 2018.
58. POLTURAK, G.; GROSSMAN, N.; VELA-CORCIA, D.; DONG, Y.; NUDEL, A.; PLINER, M.; LEVY, M.; ROGACHEV, I.; AHARONI, A. Engineered gray mold resistance, antioxidant capacity, and pigmentation in betalain-producing crops and ornamentals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 34, p. 9062-9067, 2017.
59. RUB, R. A.; PATI, M. J.; SISSQUI, A. A.; MOGHE, A. S.; SHAIKH, N. N. Characterization of anticancer principles of *Celosia argentea* (Amaranthaceae). **Pharmacognosy Research**, v. 8, n. 2, p. 97-104, 2016.
60. RUESGAS-RAMON, M.; FIGUEROA-ESPINOZA, M. C.; DURAND, E. Application of deep eutectic solvents (DES) for phenolic compounds extraction: overview, challenges, and opportunities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 18, p. 3591-3601, 2017.

61. SAPONJAC, V. T.; CANADANOVIC-BRUNET, J.; CETKOVIC, G.; JAKISIC, M.; DJILAS, S.; VULIC, J.; STAJCIC, S. Encapsulation of beetroot pomace extract: Rsm optimization, storage and gastrointestinal stability. **Molecules**, v. 21, p. 584-601, 2016.
62. SAVI, L. K.; DIAS, M. C. G. C.; CARPINE, D.; WASZCZYNSKYJ, N.; RIBANI, R. H.; HAMINIUK, C. W. Natural deep eutectic solvents (NADES) based on citric acid and sucrose as a potential green technology: a comprehensive study of water inclusion and its effect on thermal, physical and rheological properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 3, p. 898-907, 2019.
63. SHEKAARI, H.; ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; SHAYANFAR, A.; MOKHTARPOUR, M. Effect of choline chloride/ethylene glycol or glycerol as deep eutectic solvents on the solubility and thermodynamic properties of acetaminophen. **Journal of Molecular Liquids**, v. 249, n. 29, p. 1222-1235, 2018.
64. SILVA, D. V. T.; BAIÃO, D. S.; SILVA, F. O.; ALVES, G.; PERRONE, D.; AGUILA, E. M.; PASCHOALIN, V. M. F. Betanin, a natural food additive: stability, bioavailability, antioxidant and preservative ability assessments. **Molecules**, v. 24, p. e458, 2019.
65. SPÓRNA-KUCAB, A.; MILO, A.; KUMORKIEWICZ, A.; WYBRANIEC, S. Studies on polar high-speed counter-current chromatographic systems in separation of amaranthine-type betacyanins from *Celosia* species. **Journal of Chromatography B**, v. 1073, p. 96-103, 2018.
66. STINTZING, F. C.; CARLE, R. In Food Colorants: Chemical and Functional Properties. **CRC Press: Boca Raton**, p. 277-302, 2008.
67. STINTZING, F.C.; CARLE, R. Betalains-emerging prospects for food scientists. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 10, p. 514-525, 2007.
68. STINTZING, F. C.; CARLE, R. Betalains in Food: Occurrence, Stability, and Postharvest Modifications. **CRC Press: Boca Raton**, p. 277-299, 2008.
69. STRACK, D.; VOGT T.; SCHLIEMANN W. Recent advances in betalain research. **Phytochemistry**, v. 62, n. 3, p. 247-269, 2003.
70. TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 733-749, 2008.
71. TIVELLI, S. W.; FACTOR, T. L.; TERAMOTO, J. R. S.; FABRI, E. G.; MORAES, A. R. A.; TRANI, P. E.; MAY, A. Beterraba: do Plantio a Comercialização. Série Tecnologia APTA. Boletim Técnico IAC, 210. Campinas Instituto Agrônômico, 2011. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/48016/1/Andre-May-Boletim-Tec-IAC.pdf>> Acesso em: 03/01/2019.
72. THIRUGNANASAMBANDHAM, K.; SIVAKUMAR, V. Microwave assisted extraction process of betalain from dragon fruit and its antioxidant activities. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 16, n. 1, p. 41-48, 2017.

73. OSCH, D. J. G. P.; CARIN H. J. T. DIETZ, C. H. J. T.; SPRONSEN, J. V.; KROON, M. C.; GALLUCCI, F.; ANNALAND, M. V. S.; TUINIER, M. A Search for Natural Hydrophobic Deep Eutectic Solvents Based on Natural Component. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 7, n. 3, p. 2933-2942, 2019.
74. OSCH, D. J. G. P.; ZUBEIR, L. F.; VAN DEN BRUINHORST, A.; ROCHA, M. A.; KROON, M. C. Hydrophobic Deep Eutectic Solvents as Water-Immiscible Extractants. **Green Chemistry**, v. 17, p. 4518-4521, 2015.
75. VIEIRA, V.; PIETRO, A. M.; BARROS, L.; COUTINHO, J. A. P.; FERREIRA, I. C. F.; FERREIRA, O. Enhanced extraction of phenolic compounds using choline chloride based deep eutectic solvents from *Juglans regia* L. **Industrial Crops and Products**, v. 115, p. 261-271, 2018.
76. ZHAO, B. Y.; XU, P.; YANG, F. X.; WU, H.; ZONG, M. H.; LOU, W. B. Biocompatible deep eutectic solvents based on choline chloride: characterization and application to the extraction of rutin from *Sophora japonica*. **ACS Sustainable Chemistry and Engineers**, v. n. 11, 3, p. 2746-2755, 2015.
77. WYBRANIEC, S.; NOWAK-WYDRA, B. MAMMILLARININ. A new malonylated betacyanin in fruits of Mammillaria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 20, p. 8138-8143, 2007.
78. YEN, G. C.; CHEN, H. Y. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 27-32, 1995.