

BRUNA VILARINO RAMOS

**EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO
BACUPARI (*Garcinia gardneriana*) UTILIZANDO SOLVENTE EUTÉTICO
PROFUNDO NATURAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Rita de Cássia Superbi de Sousa

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R175e
2022 Ramos, Bruna Vilarino, 1995-
Extração assistida por micro-ondas de compostos bioativos do
bacupari (*Garcinia gardneriana*) utilizando solvente eutético profundo
natural / Bruna Vilarino Ramos. - Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (96 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Rita de Cássia Superbi de Sousa.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Química, 2022.

Referências bibliográficas: f. 85-95.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.612>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Extração por solventes. 2. Química verde. 3. Extração
(Química). 4. Micro-ondas. 5. Superfícies de resposta (Estatísticas). I.
Sousa, Rita de Cássia Superbi de, 1983-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química. III. Título.

CDD 22. ed. 660.284248

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552

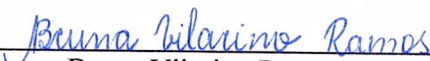
BRUNA VILARINO RAMOS

**EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO
BACUPARI (*Garcinia gardneriana*) UTILIZANDO SOLVENTE EUTÉTICO
PROFUNDO NATURAL**

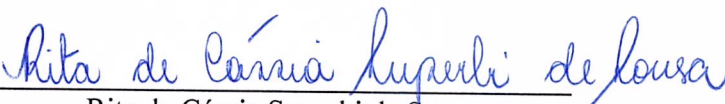
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de julho de 2022.

Assentimento:



Bruna Vilarino Ramos
Autora



Rita de Cássia Superbi de Sousa
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar saúde e discernimento para conseguir superar as adversidades de uma pós-graduação durante uma pandemia;

Aos meus pais, Cidinha e José Roberto, que acreditaram que eu seria capaz de vencer mais este desafio. Obrigada pela certeza de ter um porto seguro em vocês, meu amor e sentimento de gratidão é eterno;

Aos meus irmãos, Betânia e Beto, que apesar da distância, estão sempre presentes em minha vida, me fortalecendo e apoiando minhas escolhas;

Ao meu noivo Victor, pelo companheirismo, amor, estímulo diário e por não medir esforços para estar sempre presente. Saiba que seu apoio foi imprescindível para finalizar este trabalho. Aos meus sogros Cleire e Pedro pela consideração e carinho a mim dispensados;

À Professora Rita de Cássia, pela orientação, profissionalismo e incentivo nos momentos mais difíceis dessa jornada. Obrigada por acreditar que seria possível chegarmos até aqui e por me guiar nos primeiros passos da pós-graduação;

Ao Professor Marcelo Henrique pela coorientação, pelas importantes discussões sobre o tema, pela disponibilidade, atenção e todo o apoio prestado;

Aos membros do Laboratório PROTEC pela boa convivência, apesar de curta, em especial à Samantha pelo auxílio e amizade. Ao Professor Sérgio do Laboratório GQSB pela assistência com equipamentos e insumos, e ao Gabriel, pela contribuição e generosidade. Ao Laboratório LASA, em especial à Jodieh, por todo o auxílio técnico e incentivo;

Aos membros da banca examinadora, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação;

À minha amiga Michelle, pela parceria desde a graduação e a sua família pelo carinho e acolhimento. Aos amigos da República Tipo Fiona, Josi, Luane, Ana, Bárbara e Hugo, obrigada por todo apoio ao longo desta fase. Dividimos a casa, os sonhos, as dificuldades e as alegrias. Levarei comigo todos os momentos vividos com vocês e seus familiares em meu coração.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química por todo aprendizado pessoal e profissional;

À Universidade Federal de Viçosa que tornou possível a realização deste mestrado;

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

BIOGRAFIA

BRUNA VILARINO RAMOS, nascida em Peçanha, no estado de Minas Gerais, em 21 de junho de 1995. Filha de José Roberto Alexandre Vilarino e Maria Aparecida Ramos Vilarino, irmã de Betânia Vilarino Ramos e Marcos Roberto Souto Vilarino. Graduiu-se em Engenharia Química pela Universidade Federal de São João del Rei em dezembro de 2019. Em 2020 iniciou o Mestrado em Engenharia Química na Universidade Federal de Viçosa e o concluiu em 2022.

“O caminho para a pesquisa científica é um exercício de humildade. É preciso ser grande de alma para aceitar ser pequeno nos muitos desafios do caminho.”

(Autor desconhecido)

RESUMO

RAMOS, Bruna Vilarino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2022. **Extração assistida por micro-ondas de compostos bioativos do bacupari (*Garcinia gardneriana*) utilizando solvente eutético profundo natural.** Orientadora: Rita de Cássia Superbi de Sousa.

Este estudo explora o desempenho de solventes alternativos, mais precisamente de um solvente eutético profundo natural (NADES), na extração assistida por micro-ondas de compostos bioativos de *Garcinia gardneriana* (Planch. & Triana) Zappi. Conhecida popularmente como bacupari, a espécie é muito conhecida na medicina popular no Brasil e vem se destacando devido a suas propriedades terapêuticas como ação anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, anti-HIV, dentre outras. Tais propriedades estão associadas à presença expressiva de compostos bioativos como benzofenonas, biflavonoides e compostos fenólicos em geral. No entanto, a extração desses compostos bioativos utiliza comumente solventes orgânicos, em geral altamente tóxicos e não biodegradáveis. Nesse contexto, objetiva-se nesta pesquisa realizar uma extração com uma alternativa mais sustentável de solvente, com o intuito de reduzir a poluição ambiental gerada pelo uso de solventes orgânicos. Para isso, o NADES resultante da mistura de cloreto de colina e ácido oxálico (1:1 molar) foi utilizado para extrair compostos bioativos majoritários em sementes de bacupari. Uma metodologia estatística de superfície de resposta CCRD 2³ foi proposta para este estudo, a fim de avaliar a influência das variáveis: temperatura, concentração de biomassa (razão biomassa/solvente) e fração de água adicionada ao solvente (razão água/solvente), na extração dos compostos majoritários Fukugetina, Guttiferona-A e 7-Epiclusianona, já extraídos nesta espécie. Posteriormente, comparou-se o extrato obtido pelo NADES com os extratos obtidos com solventes convencionais selecionados (etanol, acetato de etila e água) por quantificação cromatográfica (HPLC), teor de fenólicos, flavonoides e capacidade antioxidante. Para o sistema testado, a análise estatística realizada pelo software Statistica 7.0 apontou que o ponto ótimo para maior rendimento de Fukugetina corresponde a 75 °C de temperatura, 30 % m/v de biomassa no solvente e 15,75 % v/v de adição de água ao NADES. O solvente verde apresentou maior potencial e seletividade para extrair o composto Fukugetina, enquanto etanol e acetato de etila foram mais efetivos para os demais compostos investigados.

Palavras-chave: Química verde. NADES. Extração. Micro-ondas. Metodologia de Superfície de Resposta.

ABSTRACT

RAMOS, Bruna Vilarino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2022. **Microwave assisted extraction of bacupari (*Garcinia gardneriana*) bioactive compounds by natural deep eutectic solvent.** Adviser: Rita de Cássia Superbi de Sousa.

This study explores the performance of alternative solvents, more precisely of a natural deep eutectic solvent (NADES), in the microwave-assisted extraction of bioactive compounds of *Garcinia gardneriana* (Planch. & Triana) Zappi. Popularly known as bacupari, the species is well known in popular medicine in Brazil and has been highlighted due to its therapeutic properties such as anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, and anti-HIV actions, among others. These properties are associated with the expressive presence of bioactive compounds such as benzophenones, biflavonoids, and phenolic compounds in general. However, the extraction of these bioactive compounds commonly uses organic solvents, in general highly toxic and non-biodegradable. In this context, this research aims to perform an extraction with a more sustainable alternative solvent, in order to reduce environmental pollution generated by the use of organic solvents. For this, NADES resulting from the mixture of choline chloride and oxalic acid (1:1 molar) was used to extract major bioactive compounds in bacupari seeds. A statistical response surface methodology CCRD 2³ was proposed for this study to evaluate the influence of the variables: temperature, biomass concentration (biomass/solvent ratio) and fraction of water added to the solvent (water/solvent ratio), on the extraction of the major compounds Fukugetin, Guttiferone-A and 7-Epiclusianone, already extracted in this species. Subsequently, the extract obtained by NADES was compared with the extracts obtained with selected conventional solvents (ethanol, ethyl acetate and water) by chromatographic quantification (HPLC), phenolic content, flavonoids and antioxidant capacity. For the system tested, the statistic analysis performed by the Statistica 7.0 software indicated that the optimum point for the highest yield of Fukugetin corresponds to 75°C of temperature, 30% of biomass in solvent and 15.75% of water added to the NADES. The green solvent showed higher potential and selectivity to extract the compound Fukugetin, while ethanol and ethyl acetate were more effective for the other compounds investigated.

Keywords: Green chemical. NADES. Extraction. Microwave. Response Surface Metodology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição geográfica do bacupari (<i>G.gardneriana</i>) no Brasil.....	21
Figura 2 - Partes da planta <i>G. gardneriana</i>	22
Figura 3 - Principais funções do metabolismo secundário em plantas medicinais	23
Figura 4 – Fórmula estrutural do composto Guttiferona-A.....	24
Figura 5 - Fórmula estrutural do composto 7-Epiclusianona	24
Figura 6 - Fórmula estrutural do composto Fukugetina	25
Figura 7- Número de publicações anuais sobre DES e NADES segundo a base de dados Web of Science, de 2004 a Março de 2022.....	33
Figura 8 - Distribuição mundial das publicações envolvendo DES/NADES, nos últimos 20 anos.....	34
Figura 9 - Diagrama de fases comparativo de um sistema eutético resultante de uma mistura líquida ideal e de um eutético profundo	35
Figura 10 - Demonstração da formação de um Planejamento Composto Central para 3 fatores (k=3)	41
Figura 11 - Etapas de preparo da matéria prima para o processo de extração	44
Figura 12 - Esquema do processo de extração assistida por micro-ondas, utilizando NADES.....	47
Figura 13 - Visão geral das etapas realizadas após a extração assistida por micro-ondas	48
Figura 14 - Fruto do bacupari (<i>Garcinia gardneriana</i>).....	52
Figura 15 - Semente seca do bacupari e após a cominuição	52
Figura 16 - Porcentagem de decréscimo da massa de semente durante o período de secagem.....	54
Figura 17 - Cromatograma dos padrões dos compostos Fukugetina ($t_R = 2,5$ min), Guttiferona-A ($t_R = 37,3$ min) e 7-Epiclusianona ($t_R = 53,6$ min) em comprimento de onda de 254 nm.....	56
Figura 18 - Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para extração de fukugetina	59
Figura 19 - Gráfico de probabilidade normal dos efeitos para CCRD 2^3	60
Figura 20 - Gráfico de probabilidade normal dos resíduos brutos para o planejamento CCRD.....	61
Figura 21 - Distribuição dos resíduos para o planejamento CCRD 2^3	62
Figura 22 – Gráficos de contorno 2D ajustadas ao planejamento CCRD 2^3 para extração de Fukugetina	63

Figura 23 - Superfície de resposta do planejamento CCRD 2 ³ para o composto Fukugetina..	64
Figura 24 - Perfil sinal/ruído (previstos/otimizados) e perfil de desejabilidade para o CCRD 23 para extração de Fukugetina	66
Figura 25 - Cromatograma obtido por HPLC-UV ($\lambda=254\text{nm}$) do extrato da biomassa de semente de bacupari utilizando água como solvente (Extrato E1)	70
Figura 26 - Cromatograma obtido por HPLC-UV ($\lambda=254\text{nm}$) do extrato da biomassa de semente de bacupari utilizando etanol como solvente (Extrato E2).....	71
Figura 27 - Cromatograma obtido por HPLC-UV ($\lambda=254\text{nm}$) do extrato da biomassa de semente de bacupari utilizando acetato de etila como solvente (Extrato E3)	71
Figura 28 - Cromatograma obtido por HPLC-UV ($\lambda=254\text{nm}$) do extrato da biomassa de semente de bacupari utilizando NADES [Ch]Cl: AO como solvente (Extrato E4)	72
Figura 29 - Cromatograma obtido por HPLC-UV ($\lambda=254\text{nm}$) do extrato da biomassa de semente de bacupari utilizando NADES [Ch]Cl: AO como solvente (Extrato E5)	72
Figura 30 - Cromatograma obtido por HPLC-UV ($\lambda=254\text{nm}$) do extrato da biomassa de semente de bacupari utilizando NADES [Ch]Cl: AO como solvente (Extrato E6)	73
Figura 31 - Comparativo entre a capacidade de extração dos solventes convencionais e do NADES para o biocomposto Fukugetina	76
Figura 32 - Teor de polifenóis em extratos obtidos a partir dos solventes: NADES, etanol, acetato de etila e água.....	78
Figura 33 - Gráfico comparativo entre a capacidade de extração de flavonoides de semente de bacupari utilizando os solventes NADES, etanol, água e acetato de etila.....	79
Figura 34 - Reação de estabilização do radical DPPH na presença de compostos antioxidantes (RH) presentes nos extratos de semente de bacupari	80
Figura 35 - Decaimento da absorbância de DPPH nos extratos semente de bacupari E1, E2, E3, E4, E5 e E6.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais compostos bioativos encontrados em <i>G. gardneriana</i> e atividades biológicas.....	25
Tabela 2 - Classe de compostos fenólicos segundo sua estrutura básica molecular	28
Tabela 3 - Principais solventes utilizados na extração de compostos bioativos de <i>G. gardneriana</i>	31
Tabela 4 - Fórmula geral de classificação de DES	36
Tabela 5 - Tipo de solventes eutéticos de acordo com a composição de mistura	36
Tabela 6 - Lista de reagentes	44
Tabela 7 - Variáveis e seus níveis empregados em um Planejamento Composto Central	45
Tabela 8 - Matriz de contraste dos coeficientes do CCRD a 3 variáveis para a extração utilizando NADES	46
Tabela 9 - Massa das sementes antes e após o processo de secagem e massa de água perdida no em cada replicata	53
Tabela 10 - Conteúdo de umidade livre da semente de bacupari em base úmida (X') e em base seca (X).....	53
Tabela 11 - Equação da reta de ajuste linear das curvas analíticas dos compostos padrões Fukugetina, Guttiferona-A e 7-Epiclusianona e respectivos tempos de retenção obtidos após análise HPLC	55
Tabela 12 - Concentração dos compostos Fukugetina, Guttiferona-A e 7-Epiclusianona em extrato bruto de semente de bacupari, com NADES como solvente extrator, segundo ensaios do CCRD 2 ³	57
Tabela 13 - Estimativa dos efeitos para o planejamento CCRD 23 para a extração do biocomposto Fukugetina por NADES	58
Tabela 14 - ANOVA para o CCRD 2 ³ para extração de Fukugetina	61
Tabela 15: Valores ótimos para a extração de Fukugetina com NADES segundo o perfil de desejabilidade (Statistica 7.0).....	66
Tabela 16 - Extratos avaliados na determinação de fenólicos, flavonoides e capacidade antioxidante	69
Tabela 17 - Concentração média dos biocompostos Fukugetina, Guttiferona-A e 7-Epiclusianona, nos extratos selecionados de NADES, etanol, acetato de etila e água.....	74
Tabela 18 - Conteúdo fenólico total médio dos extratos de semente de bacupari utilizando NADES, etanol, acetato de etila e água como solvente extrator	77

Tabela 19 - Teor de flavonoides totais em extratos de semente de bacupari utilizando NADES, etanol, acetato de etila e água como solvente extrator	78
Tabela 20 - Razão de extrato em solução de etanol 80% para teste de atividade antioxidante	79
Tabela 21 - Avaliação quantitativa dos extratos selecionados quanto ao percentual de atividade antioxidante.....	82

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
[Ch]Cl	Cloreto de Colina
[Ch]Cl:AO	Mistura de Cloreto de Colina e Ácido Oxálico
CCRD	Central Composite Rotacional Design
DES	Deep eutectic solvent (Solvente eutético profundo)
DOE	Design of Experiments (Design de experimentos)
DPPH	1-difenil-2-picrilhidrazila
EPI	7-Epiclusianona
FUK	Fukugetina
GB-1a	I-3,II-8-binaringenina
GB-2a	I-3-naringenina-II-8-eriodictiol
GB2a-II-4'-OMe	I-3-naringenina-II-8-4'-OMe-eriodictiol
GUT	GuttiFERona-A
HBA	<i>Hydrogen bond acceptor</i> (Receptor de ligação de hidrogênio)
HBD	<i>Hydrogen bond donor</i> (Doador de ligação de hidrogênio)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência)
MAE	<i>Microwave assisted extraction</i> (Extração assistida por micro-ondas)
NADES	Natural Deep Eutectic Solvent (Solvente eutéticos profundo natural)
UFV	Universidade Federal de Viçosa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Justificativa	19
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo Geral.....	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1. Bacupari	21
3.1.1. Principais compostos bioativos do bacupari.....	22
3.2. Compostos fenólicos.....	27
3.2.1. Compostos antioxidantes	29
3.4. Extração por solventes	30
3.5. Solventes empregados na extração de biocompostos do bacupari	31
3.6. Solventes eutéticos profundos (DES)	34
3.7. Solventes eutéticos profundos naturais (NADES).....	37
3.7.1. Sistema de NADES.....	38
3.7. Extração assistida por micro-ondas (MAE).....	39
3.8. Planejamento e otimização de experimentos	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1. Matéria Prima	43
4.2. Reagentes	44
4.2.1. Preparo dos NADES	45
4.3. Planejamento experimental.....	45
4.4. Procedimento de extração	46
4.5. Caracterização do extrato.....	48
4.5.1. Determinação de compostos fenólicos totais.....	49

4.5.2. Determinação de flavonóides	49
4.5.3. Estudo in vitro da atividade sequestradora de radicais livres (DPPH)	50
4.5.4. Cromatografia líquida de alta eficiência com detector-UV	50
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1. Otimização da extração de biocompostos de semente de bacupari usando DES	54
5.1.1. Otimização da extração de Fukugetina.....	57
5.1.2. Otimização da extração de Guttiferona e 7-Epiclusianona.....	67
5.2. Perfis comparativos: NADES x solventes convencionais para extração das biomoléculas.....	69
5.2.1. Quantificação cromatográfica de extratos selecionados.....	69
5.2.2. Determinação de compostos fenólicos de extratos selecionados usando NADES e solventes convencionais.....	77
5.2.3. Determinação do teor de flavonoides totais em extratos selecionados usando NADES e solventes convencionais	78
5.2.4. Capacidade antioxidante	79
6. CONCLUSÕES	83
7. PERSPECTIVAS	84
REFERÊNCIAS	85
APÊNDICE A	96

1. INTRODUÇÃO

Desde o surgimento da espécie humana, as plantas desempenham importante papel no tratamento, cura e prevenção de doenças (DAR; SHAHNAWAZ; QAZI, 2017). Ainda hoje, as plantas medicinais são base importante para o sistema de saúde de uma parcela da população mundial, principalmente no âmbito da atenção primária de saúde de países em desenvolvimento (BRASIL, 2016). Alguns fatores contribuem para a manutenção do uso de plantas como recurso medicinal atualmente, como o alto custo de medicamentos convencionais, as limitações no acesso à saúde, além do forte apelo histórico e cultural exercido pela fitoterapia em diversas regiões do mundo (AGRA; BARBOSA-FILHO, 2008; JOY *et al.*, 2001; DAR; SHAHNAWAZ; QAZI, 2017).

No Brasil, o uso de plantas medicinais é facilitado em decorrência da flora bastante diversificada, com mais de 46000 espécies vegetais conhecidas no país (BRASIL, 2021) e do baixo custo associado. Entretanto, os estudos sobre ação terapêutica, farmacológica e composição fitoquímica de muitas espécies ainda são desconhecidas ou incipientes (SANTA-CECÍLIA *et al.*, 2013; BRASIL, 2016).

As plantas são capazes de sintetizar e conservar em seus órgãos variados compostos, notadamente, uma classe denominada metabólitos secundários, para os quais se atribuem direta ou indiretamente, variadas ações terapêuticas presentes nestas matrizes vegetais (LOVKOVA *et al.*, 2001). Alcaloides, terpenos, compostos fenólicos, glicosídeos e polissacarídeos são classes de particular interesse em relação aos seus efeitos terapêuticos (LOVKOVA *et al.*, 2001). Estas substâncias podem ser derivadas de toda a planta ou de diferentes partes dela, como folhas, caule, casca, raiz, flor, semente, cerne e exsudatos vegetais (JAIN, 2015).

É notável o grande avanço em pesquisas envolvendo o estudo de plantas medicinais, seus compostos químicos e farmacológicos. Investigações científicas demonstraram que uma parcela dessas substâncias é potencialmente extraível para diversas aplicações como: produção de medicamentos fitoterápicos, insumos para a indústria farmacêutica e cosmética, além de matérias-primas industriais em geral (JOY *et al.*, 2001; DAR; SHAHNAWAZ; QAZI, 2017).

Espécies vegetais do gênero *Garcinia* (*Rheedia*) apresentam uma diversidade de compostos biologicamente ativos e são muito usados na medicina popular principalmente no tratamento de inflamações, anemias, na cicatrização de feridas (AGRA; BARBOSA-FILHO, 2008; SAMARÃO, 2010), constipações intestinais e outras enfermidades (JOY *et al.*, 2001).

Uma das plantas pertencentes a este gênero é o bacupari, nome popular atribuído à espécie *Garcinia gardneriana*. Estudos demonstram diversas atividades farmacológicas em extratos de suas folhas e frutos, como potencial atividade antimicrobiana (SAMARÃO *et al.*, 2010; MURATA, 2008) e anticâncer, potencial ação antiproliferativa frente a células derivadas de tumores malignos humanos (MURATA, 2008), ação antioxidante (SANTA-CECÍLIA *et al.*, 2011), anti-inflamatória (CASTARDO *et al.*, 2008), antibacteriana (SANTOS *et al.*, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2008) e analgésicas (CECHINEL-FILHO *et al.*, 2000).

As técnicas convencionais de obtenção de compostos bioativos de plantas utilizam comumente solventes orgânicos devido à eficiência e facilidade de uso (CUNHA; FERNANDES, 2018). Entretanto, esta escolha pode acarretar desvantagens ao processo como alta demanda de solvente, alto custo, elevada toxicidade associada, volatilidade, inflamabilidade, baixa seletividade e geração de resíduos prejudiciais à saúde e ao meio ambiente (CUNHA; FERNANDES, 2018; CHEMAT *et al.*, 2019) e necessidade de eliminação do solvente para recuperação dos compostos naturais de interesse. Dessa forma, cresce a busca por solventes alternativos e ambientalmente seguros em decorrência do incentivo a políticas de consumismo verde e regulamentações governamentais contra o uso indiscriminado de produtos químicos tóxicos (PAL; JADEJA, 2018).

Dentre a gama de solventes existentes hoje, os solventes eutéticos profundos (do inglês *Deep Eutectic Solventes* - DES) têm sido considerados alternativas eficientes aos solventes orgânicos na extração de produtos naturais, por apresentarem características relevantes como: baixa volatilidade, boa estabilidade química e térmica, alta capacidade de solubilização, alta condutividade, menor toxicidade, fácil acesso e baixo custo (VANDA *et al.*, 2018; BI; TIAN; ROW, 2013). Além disso, por se tratar de um solvente formado a partir da mistura de um composto doador de ligação de hidrogênio (do inglês *hydrogen bond donor* - HBD) e um receptor de ligação de hidrogênio (do inglês *hydrogen bond acceptor* - HBA) (SMITH; ABBOTT; RYDER, 2014), apresenta propriedades ajustáveis quando precursores apropriados são selecionados para a mistura, criando solventes mais eficientes e seletivos (ZHANG *et al.*, 2012, SMITH; ABBOTT; RYDER, 2014) em comparação a outros solventes considerados menos agressivos como água e etanol.

Uma subclasse bastante conhecida dos DES são os solventes eutéticos profundos naturais (do inglês *natural deep eutectic solvent* – NADES), que são assim denominados por serem constituídos a partir de compostos naturais, mais precisamente metabólitos primários (CRAVEIRO *et al.*, 2016; FERNÁNDEZ *et al.*, 2018) e por isso apresentam maior biodegradabilidade (SAVI, 2019).

Estudos recentes apontaram para a viabilidade de DES e NADES na recuperação de biocompostos como polifenóis em diversas matrizes vegetais (BUBALO *et al.*, 2016; BI; TIAN; ROW, 2013; PAL; JADEJA, 2018), inclusive em plantas do mesmo gênero (*Garcinia*). Mulia e colaboradores (2019) realizaram a extração na espécie *G. mangostana*, utilizando solventes eutéticos profundos resultantes da mistura entre cloreto de colina e polialcoóis (1-2-propanodiol, 1,3-propanodiol e 1,2-butanodiol) o que resultou em altos rendimentos de extração do composto de interesse, principalmente para o solvente composto da mistura [Ch]Cl-1,2-propanodiol, resposta que os autores associaram principalmente à polaridade adequada do DES. Os mesmos autores também testaram, em estudo pregresso, a extração de α -mangostina com NADES que consistiam em cloreto de colina e 4 doadores de ligações de hidrogênio (1-2 propanodiol, ácido cítrico, glicerol e glicose) (MULIA *et al.*, 2015). Em processos envolvendo matrizes vegetais, o cloreto de colina (ChCl) é um dos HBA's mais utilizados e frequentemente combinado com ácidos carboxílicos (LIMA, *et al.*, 2021). O NADES utilizado no presente trabalho é resultante da mistura entre cloreto de colina e ácido oxálico. Escolha esta, feita em virtude do baixo custo associado a estes componentes, pela eficiência de seu uso como solvente extrator em trabalhos pregressos (ALANÓN *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2021; FU *et al.*, 2021; COSTA *et al.*, 2022), pela capacidade dessas misturas em serem agentes deslignificantes eficazes (LIMA, *et al.*, 2021), além de apresentarem baixa a moderada citotoxicidade, baixa fitotoxicidade e serem altamente biodegradáveis ((RADOŁEVIĆ *et al.*, 2015).

Considerando o potencial farmacológico atribuído ao bacupari e todos os aspectos abordados acerca dos solventes utilizados em extração de matrizes vegetais, o presente estudo realizou a extração de compostos bioativos da semente do bacupari utilizando NADES à base de cloreto de colina e ácido oxálico, para avaliar a capacidade extratora deste solvente em detrimento aos solventes convencionais.

A extração foi assistida por micro-ondas, método de extração alternativo que melhora a eficiência de extração por promover maior interação soluto-solvente (DOLDLOVA *et al.*, 2021). Além disso, foi empregado em parte do estudo a Metodologia de Superfície de Resposta para otimização dos dados e redução dos custos de análise, utilizando Delineamento Composto Central Rotacional (do inglês Central Composite Rotational Design - CCRD) como modelo estatístico.

1.1. Justificativa

O presente estudo engloba uma vertente de pesquisa bastante necessária nos dias atuais: a química verde. É evidente a necessidade despontante de se investir em tecnologias sustentáveis, de modo a contribuir para processos químicos mais limpos e ambientalmente seguros. Plantas medicinais como a *G. gardneriana* são de suma importância no cenário de desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos, bem como na descoberta da cura e tratamento de diversas enfermidades.

Entretanto a etapa de extração destes compostos bioativos de alto potencial terapêutico pode prejudicar o meio ambiente, uma vez que utiliza convencionalmente solventes orgânicos geralmente tóxicos, inflamáveis e voláteis. A alternativa por solventes verdes, mais especificamente, por solventes eutéticos profundo naturais (NADES) em detrimento aos solventes orgânicos, tem como motivação uma extração mais sustentável, eficiente e seletiva.

Além disso, a exploração de novas plantas medicinais e de fitoterápicos torna-se uma estratégia valiosa para o enfrentamento da desigualdade econômica, social e regional no país, podendo gerar oportunidade de inserção socioeconômica de populações cujas regiões apresentam baixo dinamismo econômico, como consequência da agregação de valor à planta.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Realizar a extração assistida por micro-ondas de compostos bioativos em sementes do fruto bacupari (*Garcinia gardneriana*), empregando o NADES [Ch]Cl:AO como solvente alternativo aos solventes convencionais e caracterizar o extrato obtido em termos da capacidade antioxidante.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar a extração assistida por micro-ondas de semente de bacupari nas condições especificadas no planejamento experimental CCRD 2³ proposto neste estudo;
- Analisar os extratos obtidos quanto à presença dos compostos majoritários Fukugetina, 7-Epiclusianona e Guttiferona;
- Realizar a otimização estatística dos dados para investigar a influência dos seguintes parâmetros na extração: razão biomassa-solvente, temperatura de extração e fração de água adicionada ao solvente na extração utilizando NADES;
- Avaliar as condições ótimas de extração assistida por micro-ondas para o NADES;
- Realizar a extração assistida por micro-ondas de solventes convencionais (água, etanol e acetato de etila) nas condições descritas na metodologia;
- Comparar os extratos selecionados de NADES, com os extratos de solventes convencionais por meio de quantificação cromatográfica (HPLC), teor de fenólicos totais e teor de flavonoides totais;
- Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* (utilizando DPPH como radical livre) dos extratos selecionados.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Bacupari

Taxonomicamente, a espécie *Garcinia gardneriana* (Planch. & Triana) Zappi ou *Rheedia gardneriana*, pertence à família Clusiaceae (sinonímia botânica Guttiferae) (MUNIZ, 2020). Esta classe apresenta uma diversidade de plantas que incluem desde árvores a arbustos, ervas e trepadeiras lenhosas, de grande interesse econômico, seja por seus frutos, madeiras ou derivados químicos úteis principalmente nas indústrias farmacêutica e de tintas (GASPAROTTO-JÚNIOR *et al.*, 2005).

O gênero *Garcinia* L. é um dos mais numerosos da família Clusiaceae, incluindo cerca de 300 espécies (HEMSHEKHAR, 2011). Gontijo e colaboradores (2012) cita a ação de metabólitos secundários como benzofenonas, flavonoides, proantocianinas, presentes no gênero *Garcinia*, no tratamento de doenças como ulcera péptica, infecções do trato urinário e tumores. Com relação à presença de biflavonoides na família *Clusiaceae*, o gênero *Garcinia* destaca-se como o detentor do maior número de estruturas isoladas, cerca de 32 biflavonoides. (FERREIRA; CARVALHO; SILVA, 2012). Espécies do gênero também são ricas em fenólicos oxigenados e prenilados, aos quais são atribuídas atividades biológicas como ação antifúngica, anti-inflamatória e antioxidante (CUI *et al.*, 2010).

O bacupari, também chamado de bacuripari, bacoparé, bacupari-miúdo, mangostão-amarelo, dentre outros nomes, é uma espécie nativa brasileira, não endêmica e presente em todas as regiões brasileiras nos biomas: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampa, conforme representado na Figura 1, com maior incidência nas regiões de florestas pluviais (MUNIZ, 2020; LORENZI, 2002).

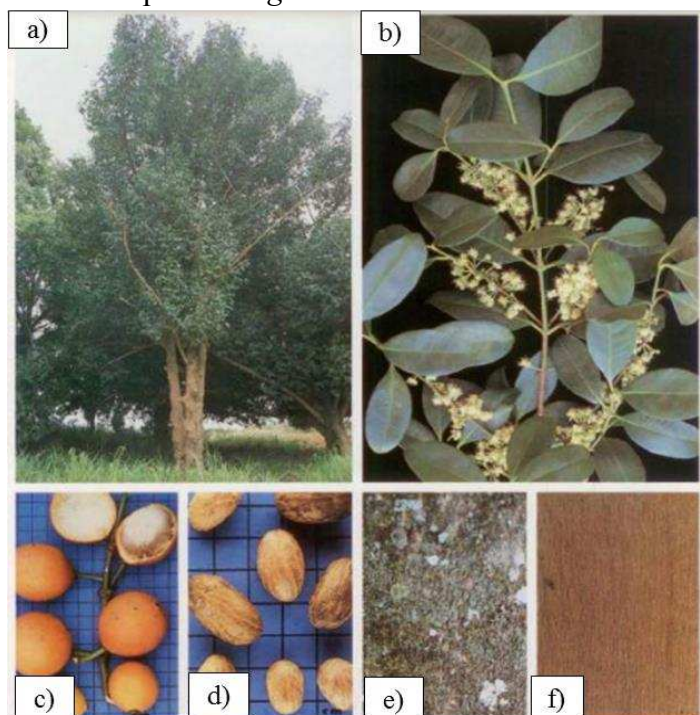
Figura 1 - Distribuição geográfica do bacupari (*G.gardneriana*) no Brasil



Fonte: Muniz (2020).

Conforme evidencia a Figura 2 a seguir, o bacuparizeiro é uma árvore de pequeno porte, com caule ereto e ramificado, folhas pecioladas com formato oblongo/elíptico. Seu fruto apresenta epicarpo liso, de formato globoso a elipsoide, com rostro proeminente (MUNIZ, 2020). Quando maduro apresenta casca de coloração amarela, e polpa branca mucilaginosa adocicada, próprios para consumo in-natura (CORRÊA, 1984). O bacupari é conhecido principalmente por comunidades ribeirinhas por seus frutos comestíveis e por suas propriedades medicinais. A madeira do bacuparizeiro também é muito utilizada na carpintaria e marcenaria para confecção de ferramentas e na construção civil (LORENZI, 2002; CORRÊA, 1984). Do ponto de vista ecológico, é uma espécie importante para a recuperação de áreas degradadas por se tratar de uma espécie nativa e servir de alimento para a fauna em geral (LORENZI, 2002).

Figura 2 - Partes da planta *G. gardneriana*¹



Fonte: Adaptado de LORENZI, (2002).

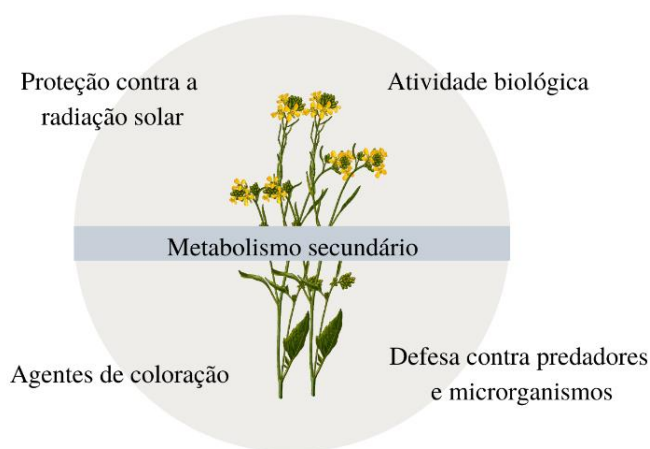
3.1.1. Principais compostos bioativos do bacupari

Compostos bioativos são substâncias de ocorrência restrita, encontradas naturalmente em organismos ou em grupos de organismos específicos, e são consideradas expressão da individualidade de espécies, em plantas, normalmente são metabólitos

¹ a) Bacuparizeiro; b) Folhas e flores; c) Bacupari; d) Semente; e) Tronco; f) Madeira tratada.

secundários. Os efeitos terapêuticos associados às plantas medicinais são resultado dessas peculiaridades químicas (LOVKOVA *et al.*, 2001; SINGH, 2015). Esses metabólitos são importantes para os organismos que os produzem, uma vez que atuam na defesa contra predadores, como atrativos voláteis e agentes de coloração para atrair ou alertar outras espécies, como protetores contra a radiação. No entanto, grande parte de seus benefícios e funções nesses organismos ainda são desconhecidas e carecem de estudos (SAVITHRAMMA *et al.*, 2011).

Figura 3 - Principais funções do metabolismo secundário em plantas medicinais



Fonte: Autoria própria.

Estudos envolvendo a *G. gardneriana* foram capazes de isolar diversos constituintes bioativos desta espécie, com destaque para compostos fenólicos como biflavonóides, xantonas e benzofenonas, além de terpenos e esteróides em diferentes regiões da planta (SANTOS *et al.*, 1999; CASTARDO *et al.*, 2008; CECHINEL-FILHO *et al.*, 2000).

As xantonas, isoladas de fontes naturais, são metabólitos secundários encontrados naturalmente em plantas superiores. Dentre as plantas com ocorrência de xantonas, destaca-se a família Clusiaceae, na qual grande parte desses compostos foram encontrados em plantas do gênero *Garcinia*. As xantonas apresentam atividades biológicas diversas e interessantes para uso farmacológico, como ação antimicrobiana, citotóxica (KAENNAKAM; SIRIPONG; TIPPYANG, 2015), antitrombótica, anti-inflamatória, antitumoral, antialérgica, antioxidante (CUI *et al.*, 2010) e anticâncer (POULI; MARAKOS, 2009).

As benzofenonas naturais, por sua vez, são uma classe de compostos com uma enorme diversidade estrutural, originadas de um esqueleto fenol-carbonil-fenol comum (WU; LONG; KENNELLY, 2014). A maioria desses compostos apresenta sua cadeia ligada a

vários números de grupos -OH, -OMe, pernil ou geranil. Algumas destas benzofenonas apresentam arranjos incomuns que resultam na presença de atividades biológicas importantes como ação antimicrobiana, anticancerígena, antiviral (WU; LONG; KENNELLY, 2014). São conhecidas também, pelo potencial antimalárico, antioxidante, antibacteriano, anti-inflamatório (ZAN *et al.*, 2018), antimicrobiano (MAIA *et al.*, 2018), antianafilático (NEVES *et al.*, 2007) e anti-HIV (GUSTAFSON; MCKEE, 1992). Cerca de 77% das benzofenonas isoladas em plantas superiores são provenientes da família Clusiaceae, a qual a espécie *G. gardneriana* pertence. Maior parte da benzofenonas presentes nesta família são compostos fenólicos não polares, cetonas fenólicas e de ocorrência restrita (CARVALHO, GOSMANN, SCHENKEL, 2007; (WU; LONG; KENNELLY, 2014). Dentre as benzofenonas com maior incidência na *G. gardneriana* estão a Guttiferona-A e a 7-Epiclusianona (RODRIGUES, 2019), com diversas atividades biológicas como apresenta a Tabela 1. As Figuras 4 e 5 apresentam as fórmulas estruturais destes dois compostos.

Figura 4 – Fórmula estrutural do composto Guttiferona-A

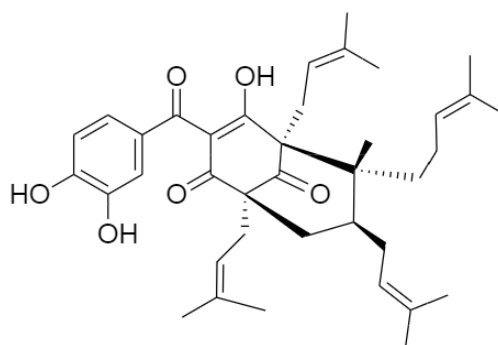
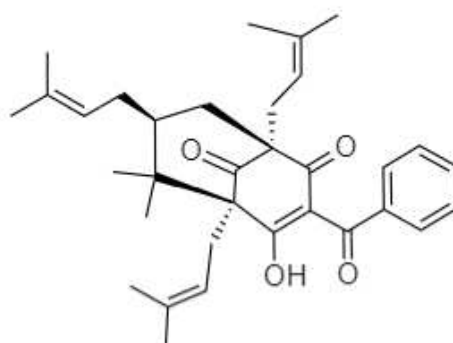
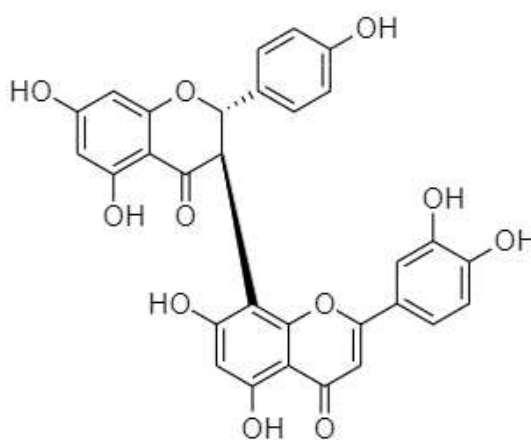


Figura 5 - Fórmula estrutural do composto 7-Epiclusianona



Os flavonoides são compostos fenólicos importantes que apresentam uma diversificada gama de compostos: antocianidinas, flavonas, flavonóis e, geralmente, em menor número, auronas, isoflavonas e calconas (SOARES, 2002). Estudos apontam para a ação antifúngica, proteção à radiação ultravioleta, ação antioxidante (WATERMAN e CRICHTON, 1980; SOARES, 2002) inibidores de enzimas, proteção contra predadores e atração de animais polinizadores (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007). A Figura 6 exibe a fórmula estrutural da Fukugetina, um dos biflavonoides de ocorrência majoritária no bacupari (RODRIGUES, 2019).

Figura 6 - Fórmula estrutural do composto Fukugetina



Os terpenos são hidrocarbonetos, alcenos naturais muito frequentes em plantas. Termo frequentemente estendido aos terpenóides, derivados oxigenados desses hidrocarbonetos. Compostos terpênicos são abundantes nos óleos essenciais, em sua maioria monoterpenos (90%) e sesquiterpenos (SIMÕES; SPITZER, 2007).

A Tabela 1 resume alguns dos principais biocompostos identificados nos extratos de *G. gardneriana*, com destaque para os compostos considerados majoritários na biomassa utilizada neste estudo (RODRIGUES, 2019), Fukugetina, Guttiferona-A e 7- Epiclusianona, que apresentaram uma variedade de atividades biológicas verificadas em diversos estudos pregressos.

Tabela 1 - Principais compostos bioativos encontrados em *G. gardneriana* e atividades biológicas.

Composto	Classe	Atividade biológica
Fukugetina/ Morelloflavona	Biflavonoide	Analgésico (LUZZI <i>et al.</i> , 1997)
		Anti-inflamatória (BERNARDI, 2009; CASTARDO <i>et al.</i> , 2008)
		Antioxidante (GONTIJO <i>et al.</i> , 2012)

		Anticâncer (RECALDE-GIL <i>et al.</i> , 2019)
		Tripanocida (ASSIS <i>et al.</i> , 2012)
		Antibacteriana (VERDI <i>et al.</i> , 2004)
		Antiviral (LIN <i>et al.</i> , 1997)
GB-1a	Biflavonoide	Antiviral (LIN <i>et al.</i> , 1997)
		Analgésica (LUZZI <i>et al.</i> , 1997)
GB-2a	Biflavonoide	Anti-inflamatória (BERNARDI, 2009; CASTARDO <i>et al.</i> , 2008)
		Anticâncer (RECALDE-GIL <i>et al.</i> , 2019)
		Antiviral (LIN <i>et al.</i> , 1997)
Volkensiflavona	Biflavonoide	Analgésico (LUZZI <i>et al.</i> , 1997)
		Antibacteriana (VERDI <i>et al.</i> , 2004)
		Analgésico (LUZZI <i>et al.</i> , 1997)
Fukugesida	Biflavonoide	Antioxidante (GONTIJO <i>et al.</i> , 2012)
		Antibacteriana (VERDI <i>et al.</i> , 2004)
GB2a-II-4'-OMe	Biflavonoide	Analgésico (CECHINEL-FILHO <i>et al.</i> , 2000)
Gb-2a-7- O - glicosídeo	Biflavonoide	Anticâncer (RECALDE-GIL <i>et al.</i> , 2019)
		Antibacteriano (VERDI <i>et al.</i> , 2004)
Epicatequina	Flavanol/ Flavonoide	Antibacteriano (VERDI <i>et al.</i> , 2004)
		Tripanocida (ALVES <i>et al.</i> , 1999)
		Anti-HIV (PICCINELLI <i>et al.</i> , 2005)
		Antimicrobiana (NALDONI <i>et al.</i> , 2009)
		Antianafilático (NEVES <i>et al.</i> , 2007)
7- Epiclusianona	Benzofenona	Antioxidante (SANTA-CECÍLIA <i>et al.</i> , 2011),
		Anti-inflamatória (SANTA-CECÍLIA <i>et al.</i> , 2011)
		Antinociceptiva (SANTA-CECÍLIA <i>et al.</i> , 2011)
		Anticâncer (ALMEIDA <i>et al.</i> , 2008, SALES <i>et al.</i> , 2015).
		Anticárie e antiproliferativa (MURATA, 2008)
		Esquistossomicida (CASTRO <i>et al.</i> , 2015)
		Anti-HIV (GUSTAFSON; MCKEE <i>et al.</i> 1992)
GuttiFERONA-A	Benzofenona	Antimicrobiana (NALDONI <i>et al.</i> 2009)
		Gastroprotetora (NIERO <i>et al.</i> , 2012)
		Anticâncer (PARDO-ANDREU <i>et al.</i> 2011).
Ácido oleanólico	Terpenoide	Nematicida (SANTOS <i>et al.</i> , 2007)
		Antibacteriana (SANTOS <i>et al.</i> , 1999a)

As folhas de *G. gardneriana* apresentaram diversos biflavonoides com efeitos analgésicos, dentre eles GB-2a, fukugetina, fukugesida, volkensiflavona (LUZZI, 1997) e GB2a-OMe (CECHINEL-FILHO *et al.*, 2000), além de atividade antibacteriana (VERDI *et*

al., 2004). Castardo e colaboradores (2008) associaram a atividade anti-inflamatória oral em edemas de pata de rato, à presença dos biflavonóides: Fukugetina e GB-2^a. Em extratos da folha do bacuparizeiro, Bernardi (2009) demonstrou a ação anti-inflamatória tópica do extrato hidroalcoólico das folhas em testes in vivo em patas de camundongos. Extratos da folha de bacupari, bem como fukugetina e GB-2a isoladas, foram capazes de reduzir o edema de orelha de camundongo induzido por óleo de cróton, reafirmando o efeito anti-inflamatório tópico destes biflavonóides (OTUKI *et al.*, 2011). O extrato bruto da semente do bacupari apresentou atividade antimicrobiana frente a bactéria *S. mutans*, principal microrganismo causador da cárie dental (SAMARÃO *et al.*, 2010). O extrato desta planta também se revelou como inibidor da atividade da tirosinase, que resultou na redução da melanogênese em células de melanoma (CAMPOS *et al.*, 2013), além de potencial antioxidante (SANTA-CECÍLIA *et al.*, 2011). Os biflavonóides fukugetina, GB-2a e GB-2a-7-O-glicose, isolados dos ramos de *G. gardneriana*, demonstraram capacidade de inibir a enzima aromatase, sendo uma nova promessa para o desenvolvimento de novos inibidores de aromatase, muito utilizados no tratamento de câncer de mama (RECALDE-GIL *et al.*, 2019). Assis e colaboradores (2013) registraram que a Fukugetina isolada possui efeito inibidor da enzima cruzaina de *Trypanosoma cruzi* e, portanto, este composto pode vir a ser um candidato a fármaco contra a doença de Chagas (ASSIS *et al.*, 2012), e também contra a Leishmaniose, por apresentar significativa atividade leishmanicida in vivo (PEREIRA *et al.*, 2010).

As benzofenonas Guttiferona-A e 7-Epiclusiana apresentam patente de invenção devido à atividade antiproteolítica, mais precisamente pelo potencial para utilização desses biocompostos na prevenção e tratamento do câncer e da AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida) (SANTOS *et al.*, 2010)

Não obstante, os estudos não descartam a possibilidade de sinergia entre os compostos presentes no extrato que podem potencializar os efeitos das moléculas bioativas. Maia e colaboradores (2018) obtiveram resultados expressivos para testes sinérgicos avaliando a interação entre as benzofenonas Guttiferona-A e 7-Epiclusianona para ação antimicrobiana contra *Streptococcus spp.* isoladas de mastite bovina.

3.2. Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são os metabólitos secundários mais numerosos, e incluem uma diversidade de estruturas simples e complexas, em que pelo menos um anel aromático possui um hidrogênio substituído por um grupamento hidroxila (CARVALHO; GOSMANN;

SCHENKEL, 2007). São amplamente distribuídos em espécies vegetais e em microrganismos (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007), mas a concentração de tais substâncias depende de uma série de fatores como variações climáticas, solo, condições de cultivo, estágio de desenvolvimento da planta, armazenagem, dentre outros (LI *et al.*, 2014).

Segundo Carvalho, Gosmann e Schenkel (2007), basicamente, os compostos fenólicos podem ser classificados de acordo com sua estrutura molecular básica, como disposto na Tabela 2, em que C6 representa o anel benzênico e CX o grupo substituinte, com X átomos de carbono e n grupamentos.

Tabela 2 - Classe de compostos fenólicos segundo sua estrutura básica molecular	
Estrutura básica	Classe
C6	Fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	Ácidos fenólicos
C6-C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-C3	Fenilpropanóides, ácidos cinâmicos e análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas, cromonas
C6-C4	Naftoquinonas
C6-C1-C6	Xantonas
C6-C2-C6	Estilbenos e antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonoides e isoflavonóides
(C6-C3) ₂	Lignanas
(C6-C3-C6) ₂	Biflavonóides
(C6) _n	Melaninas vegetais
(C6-C3) _n	Ligninas
(C6-C1) _n	Taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) _n	Taninos condensados

Fonte: CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007.

Flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos e taninos são considerados as classes fenólicas com maior distribuição no reino vegetal (PEREIRA; ANGELIS-PEREIRA, 2014). Estudos apontam que o consumo regular de alimentos ricos em compostos fenólicos resulta em uma maior promoção da saúde, na prevenção e no combate de doenças crônicas como obesidade, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer e diabetes, devido principalmente ao poder antioxidante atribuído a esses compostos (LI *et al.*, 2014; PEREIRA; ANGELIS-PEREIRA, 2014).

Nos últimos anos, muitos estudos buscaram novos métodos para a extração de

polifenóis com solventes alternativos. Nesse contexto, os DES's têm ganhado relevância devido à eficiência em extrair compostos ativos de plantas (DAI *et al.*, 2013; MA;ROW, 2017). Espino e colaboradores (2018) testaram a extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos de *L. cuneifolia*, uma planta argentina comumente usada na medicina tradicional, utilizando NADES e obtiveram uma ótima eficiência de extração, comparada aos solventes tradicionais, tanto na extração de fenólicos polares e fracamente polares. Cui et al (2021) testou estes solventes na extração de fenólicos de chá verde, obtendo ótimos rendimentos dos compostos de interesse. Doldolova e colaboradores (2021) otimizaram a extração assistida por micro-ondas de curcumina e outros compostos antioxidantes com NADES. Estes solventes também foram testados na extração de xantonas de espécies do gênero *Garcinia* (MULIA; FAUZIA; KRISANTI, 2019).

Em geral, a forma mais utilizada para quantificar fenólicos totais consiste no método que emprega reagente de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; LAZZAROTTO *et al.*, 2020). Polifenóis presentes em extratos de plantas são capazes de reagir com este reagente, que é resultado de uma mistura complexa de heteropolifosfotungstato-molibdato, para formar um complexo azul, em presença de carbonato de sódio e assim ser quantificado por espectrofotometria de luz visível, medindo a absorbância da amostra comumente a 760~765nm e comparando com a curva de calibração de ácido gálico (KUPINA *et al.*, 2018). A determinação de flavonóides totais por espectrometria em UV é uma das técnicas de simples aplicação em laboratório. Essa metodologia emprega uma solução de cloreto de alumínio (AlCl_3) para a formação de um complexo entre o cátion alumínio e os flavonóides, resultando na mudança de coloração de amarelo suave para um verde-amarelado após a reação (PROMMUAK; DE-EKNAMKUL; SHOTIPRUK, 2008).

3.2.1. Compostos antioxidantes

Antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir significativamente a oxidação de outras substâncias, sendo capazes de estabilizar os chamados radicais livres, que são espécies altamente reativas devido à presença de um ou mais íons ou elétrons desemparelhados (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Boa parte dos compostos fenólicos apresenta capacidade antioxidante. Estudos afirmam que uma dieta rica em compostos antioxidantes é cada vez mais requerida devido à capacidade atribuída a estes compostos de retardar ou prevenir patologias crônicas associadas às reações oxidativas que

ocorrem no sistema biológico (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007; PEREIRA; ANGELIS-PEREIRA, 2014).

A estrutura do composto relaciona-se com seu poder de eliminar radicais livres (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Em compostos fenólicos, em geral, essa relação é diretamente proporcional ao número de hidroxilas presentes na molécula, ou seja, quanto maior a quantidade de radicais hidroxilas, maior a capacidade antioxidante. Entretanto, essa relação não funciona completamente para todos os compostos fenólicos. No caso dos flavonoides, por exemplo, essa relação é falha em consequência da maior complexidade dessas moléculas (BALASUNDRAM; SUDRAM; SAMMAN, 2006), mas a atividade antioxidante nestes compostos é frequentemente atribuída à presença dos grupos hidroxilas fenólicos, ligados à estrutura do anel (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Há um avanço expressivo em pesquisas por novas substâncias antioxidantes principalmente de origem vegetal e, conseqüentemente são necessários métodos para avaliar essa capacidade antioxidante (OLIVEIRA, 2005). Uma técnica bastante difundida consiste na medição da capacidade redutora de antioxidantes em relação ao radical orgânico livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) na avaliação do poder antioxidante de substâncias ou misturas. Este método consiste em avaliar a reação de redução do agente oxidante por meio do monitoramento do decréscimo da absorbância em decorrência da descoloração da amostra de roxo para uma solução amarelo claro (BRAND-WILIANS; CUVELIER; BERSET, 1995).

3.4. Extração por solventes

O processo de extração sólido-líquido é uma operação unitária que consiste na separação de um ou mais componentes contidos em uma fase sólida para uma fase líquida ou solvente (IBARZ; BARBOSA-CÁNOVAZ, 2002). Os componentes transferidos da fase sólida para a líquida são chamados de solutos, enquanto o sólido insolúvel é chamado de inerte (IBARZ; BARBOSA-CÁNOVAZ, 2002). Mais precisamente, a fim de separar o constituinte desejado ou remover um componente indesejado, o sólido é colocado em contato com a fase líquida. Dessa forma, um ou mais solutos podem se difundir da fase sólida para a líquida, resultado na separação dos componentes originalmente presentes no sólido (GEANKOPLIS, 1993).

Em indústrias de processos biológicos e de alimentos, muitos compostos são separados por extração sólido-líquido. No caso de plantas medicinais, diferentes produtos são

obtidos a partir do contato de raízes, folhas, sementes e caules com solventes orgânicos, na maior parte das vezes (GEANKOPLIS, 1993). As condições em que o processo de extração é submetido (como escolha do solvente, técnica empregada, temperatura, tamanho da partícula, proporção soluto-solvente), são algumas das variáveis de processo que podem melhorar ou prejudicar o rendimento da extração de biocompostos (PINELO *et al.*, 2004). Os processos padronizados mais utilizados na obtenção de extratos vegetais incluem maceração, percolação, Soxhlet, infusão e decocção, enquanto outras técnicas não tão convencionais também se destacam como o uso de fluídos supercríticos, extração por micro-ondas e por ultrassom (RODRIGUES *et al.*, 2016; YUNPU *et al.*, 2016).

É notável que o processo de extração depende fortemente do solvente e de suas características químicas, bem como da matriz vegetal e sua complexa estrutura e composição, o que remonta em comportamentos distintos de acordo com o sistema sólido-solvente construído (PINELO *et al.*, 2004).

3.5. Solventes empregados na extração de biocompostos do bacupari

A eficiência do processo de extração está intimamente ligada à escolha do solvente adequado. Para a obtenção de extratos de plantas, utilizam-se comumente solventes orgânicos, devido a vantagens como alto rendimento. No entanto, existem algumas desvantagens como alto custo, grande volume de solvente gasto, volatilidade, além de serem originados de fontes não renováveis e prejudiciais ao meio ambiente e à saúde (CUNHA; FERNANDES, 2018). Outra problemática é acerca da toxicidade dos resíduos, que podem permanecer na amostra, além da possibilidade de oxidação que o extrato pode sofrer durante a etapa de eliminação do solvente (SEBASTIÁN, 1998).

Estudos pregressos que enfocam a extração de biocompostos de *G. gardneriana*, mostram essa tendência do uso de solventes orgânicos. A Tabela 3 a seguir, mostra alguns dos solventes citados pela literatura na extração desta planta.

Tabela 3 - Principais solventes utilizados na extração de compostos bioativos de *G. gardneriana*

Espécie	Parte da planta	Solvente extrator	Referência
<i>Garcinia gardneriana</i>	Folhas; Madeira; Sementes	Solução hidroalcoólica (50%)	BERNARDI, 2012 OTUKI <i>et al.</i> , 2011
	Folhas	Solução hidroalcoólica	CAMPOS <i>et al.</i> , 2013;

CASTARDO <i>et al.</i> , 2008; CECHINEL-FILHO <i>et al.</i> , 2000; LUZZI <i>et al.</i> , 1997		
Galhos	Etanol	RECALDE-GIL <i>et al.</i> , 2019;
Sementes	Etanol 95%	SAMARÃO <i>et al.</i> , 2010
Folhas; Frutos maduros (inteiros)	Água (vapor de água)	FERNANDEZ <i>et al.</i> , 2021
Sementes	Acetato de etila	RODRIGUES, 2019
Raízes; Casca da madeira	Benzeno	BRÁZ-FILHO; MAGALHÃES; GOTTLIEB, 1970

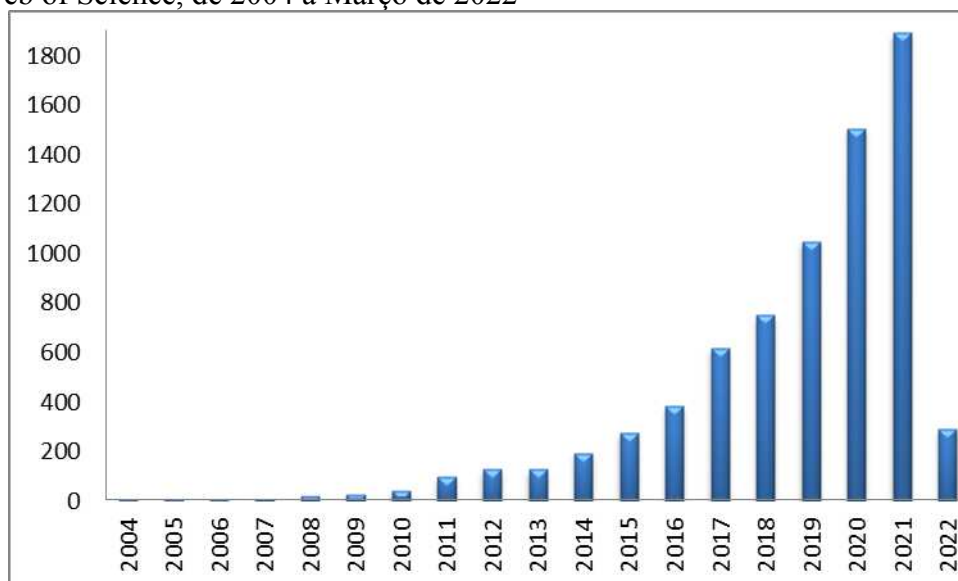
À vista disso, a tendência hoje é a busca por solventes alternativos, recicláveis e mais sustentáveis (BUBALO *et al.*, 2016). Dentre as opções de solventes que se enquadram nesta situação, pode-se citar a água, os líquidos iônicos e os solventes eutéticos profundos (DES).

Conhecida mundialmente como solvente universal, a água possui boa seletividade, de fácil acesso e sem toxicidade associada. Apesar disso, a extração utilizando somente água pura é limitada à polaridade, à capacidade hidrofílica da amostra e a determinadas faixas de temperatura, além de demandar alta energia calorífica na maioria das extrações (DOBLE; KRUTHIVENTI, 2007; FERNÁNDEZ *et al.*, 2018).

Com o desenvolvimento do conceito de química verde e a crescente necessidade de conter o uso de solventes orgânicos, há cerca de 20 anos surgiram as primeiras publicações científicas abordando o conceito e importância dos líquidos iônicos (ABBOTT *et al.*, 2001). Uma nova classe de solventes composta de sais orgânicos de baixa fusão (DAI *et al.*, 2013), constituídos de íons, que ganharam a denominação de solventes verdes devido a características como não-inflamabilidade, estabilidade, baixa volatilidade, biocompatibilidade (WELTON, 2011; YOUNG; VERPOORTE, 2019). Mas esta percepção vem mudando drasticamente, após estudos expressivos acerca do risco de sua aplicação com base em todo o ciclo de vida, o que demonstrou, por exemplo, que estes solventes podem ser prejudiciais ao meio ambiente, devido à geração de resíduos formados durante sua produção, resíduos estes, que podem ser tão prejudiciais quanto os solventes orgânicos (BUBALO *et al.*, 2016; PAIVA *et al.*, 2014).

Em detrimento aos líquidos iônicos, os DES emergiram rapidamente como uma nova alternativa na linha de solventes verdes (ABBOTT *et al.*, 2004). Ambos os solventes possuem propriedades físicas bastante semelhantes, no entanto, o alto custo e a toxicidade mais alta dos líquidos iônicos fizeram com que os DES se tornassem mais atrativos para pesquisas em diversas áreas (PENA-PEREIRA; NAMIEŚNIK, 2014). Nos últimos anos, notou-se um aumento expressivo no interesse científico em estudos envolvendo estes solventes verdes, fato que pode ser confirmado pela análise dos resultados da pesquisa dos termos “Deep eutectic solvents” e “Natural deep eutectic solvents” na base de dados Web of Science (2022). A busca destes termos resultou em 7299 publicações, das quais a primeira surge em 2004 e, desde então, apresentam um perfil crescente ao longo dos últimos anos, como demonstra a Figura 7. Segundo a base de dados, só em 2021 foram 1891 publicações, o que corresponde a quase 26% das publicações totais no período de 2004 a 2022. Até o presente momento, o ano de 2022 já possui 296 publicações (WEB OF SCIENCE, 2022).

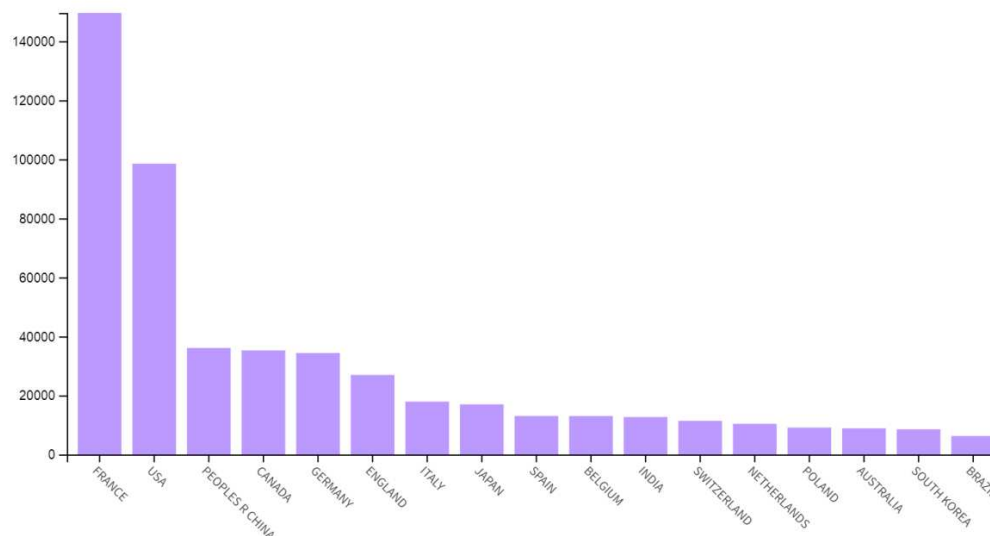
Figura 7- Número de publicações anuais sobre DES e NADES segundo a base de dados Web of Science, de 2004 a Março de 2022



Fonte: Adaptado de: Base de dados Web of Science (2022).

A análise mais criteriosa dos dados da Figura 7 aponta para um crescimento exponencial em termos de produção científica envolvendo esses solventes. A Figura 8 demonstra outra face destas publicações, que é sua distribuição mundial. Sob a ótica continental, a Europa é a região que mais pesquisa sobre este tema, com destaque para a França. Em seguida as duas maiores potências mundiais: Estados Unidos e China, enquanto o Brasil ocupa a 17ª posição no ranking.

Figura 8 - Distribuição mundial das publicações envolvendo DES/NADES, nos últimos 20 anos

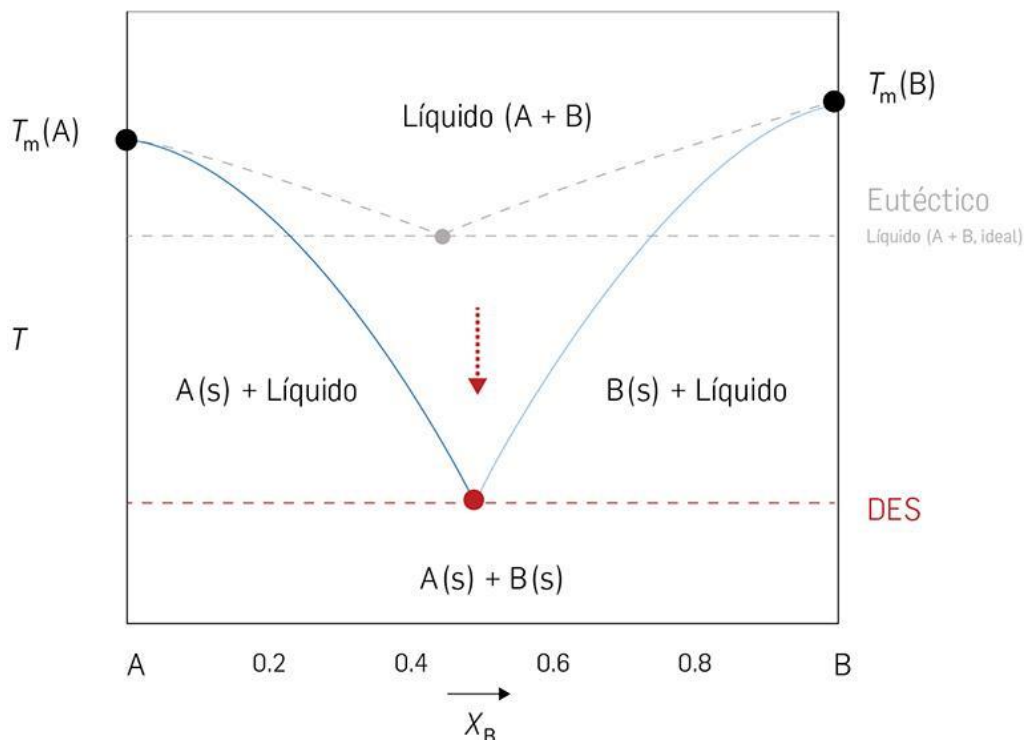


Fonte: Web of Science (2022).

3.6. Solventes eutéticos profundos (DES)

A sigla DES deriva do termo inglês ‘*Deep Eutectic Solvents*’. Estes solventes são assim denominados por apresentarem um desvio profundo da idealidade, uma vez que a mistura líquida que forma estes solventes possui ponto de fusão muito inferior ao ponto de fusão de seus componentes individuais (ABBOTT *et al.*, 2004). Avaliando os pontos de fusão do NADES utilizado no presente estudo ([Ch]Cl:AO), nota-se mais claramente esse fenômeno (Cloreto de colina – 302 a 305 °C; ácido oxálico – 101 a 102 °C; [Ch]Cl:AO – 34 °C) (GARCÍA *et al.*, 2015). Figura 9 retrata um diagrama de fases de misturas de dois componentes, fazendo um perfil comparativo entre sistemas eutéticos e sistemas eutéticos profundos (SANTOS, 2017).

Figura 9 - Diagrama de fases comparativo de um sistema eutético resultante de uma mistura líquida ideal e de um eutético profundo



Fonte: SANTOS (2017).

No diagrama de fases binário, o eixo horizontal do diagrama representa a composição da mistura, e no eixo vertical observa-se a temperatura de equilíbrio para cada composição da mistura. Assim, observa-se no ponto cinza, o ponto eutético da mistura, que mostra que na proporção ideal dos componentes A e B, essa mistura possui ponto de fusão menor que a de seus componentes puros. Quando essa diminuição dessa temperatura é muito acentuada é possível observar a formação de um sistema eutético profundo, representado na figura pelo ponto vermelho (SANTOS, 2017).

Esse abaixamento profundo do ponto de fusão é atribuído às ligações de hidrogênio intermoleculares entre as espécies que compõem os DES, quando comparado aos componentes de origem (ABBOTT *et al.*, 2004).

Segundo Smith, Abbot e Ryder (2014), os DES podem ser classificados segundo sua composição de partida, mais precisamente de acordo com o agente complexante e descritos na seguinte fórmula geral (equação 1):



Em que o termo Cat^+ corresponde ao cátion (amônio, fosfônio ou sulfônio); X^- uma base de Lewis, ou seja, uma espécie capaz de ceder pares de elétrons, em geral um ânion haleto; Y outra base de Lewis ou Bronsted para formar o complexo aniônico e z o número de

moléculas Y que interagem com o ânion (SMITH, ABBOTT, RYDER, 2014). A Tabela 4 exemplifica os tipos de DES conforme a fórmula geral citada na equação 1, utilizando haleto metálico de cloro (MCl_x) como exemplo.

Tabela 4 - Fórmula geral de classificação de DES

Tipo	Fórmula geral	Termos
Tipo I	$Cat^+ X^- zMCl_x$	M= Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In
Tipo II	$Cat^+ X^- zMCl_x \cdot H_2O$	M= Cr, Co, Cu, Ni, Fe
Tipo III	$Cat^+ X^- zRZ$	Z= $CONH_2, COOH, OH$
Tipo IV	$MCl_x + RZ = MCl_{x-1} \cdot RZ + MCl_{x+1}$	M= Al, Zn e Z= $CONH_2, OH$

R= radical com grupos doadores de prótons da ligação de hidrogênio.

Fonte: Smith, Abbott e Ryder (2014).

Em termos gerais os DES podem ser de quatro tipos, sendo os tipos I, II e IV considerados semelhantes aos líquidos iônicos (SMITH, ABBOTT, RYDER, 2014). Os tipos I, II e III são formados por uma mistura contendo um sal orgânico como o cloreto de colina e o último tipo representa uma mistura com sais metálicos como o cloreto de zinco (ABBOTT *et al.*, 2004; ZHAO; BAKER, 2012), como complementa a Tabela 5.

Tabela 5 - Tipo de solventes eutéticos de acordo com a composição de mistura

Tipo I	Sal orgânico + haletos metálicos
Tipo II	Sal orgânico + Sais metálicos hidratados
Tipo III	Sal orgânico + doadores de ligação de hidrogênio (HBD)
Tipo IV	Sal metálico+ doadores de ligação de hidrogênio (HBD)

Fonte: Adaptado de Smith, Abbott e Ryder (2014).

Os DES do tipo III têm sido de grande interesse devido à capacidade de solvatação de outras moléculas (SMITH; ABBOTT; RYDER, 2014). Normalmente, sais de amônio quaternário, como o cloreto de colina, são utilizados como receptores de ligações de hidrogênio (HBA). Como doadores de ligações de hidrogênio (HBD), compostos com variados grupos funcionais já foram reportados, tais como aminas, ácidos carboxílicos, álcoois e amidas (SMITH; ABBOTT; RYDER, 2014).

Estes solventes contam com propriedades marcantes como alta estabilidade térmica, baixa condutividade, baixa volatilidade, capacidade de serem combinadas a técnicas refinadas de caracterização como a cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa,

além de miscibilidade ajustável e solubilidade em água (ABBOTT, 2004; TANG; ZHANG; ROW, 2015). Estes solventes apresentam uma gama de possibilidades, tendo em vista que a alteração de algum dos componentes pode agregar propriedades químicas distintas, o que facilita o uso de tais solventes na extração de compostos variados (CUNHA; FERNANDES, 2018).

Algumas características destes solventes são capazes de interferir no processo extrativo. Uma das propriedades físico-químicas importantes é a viscosidade. Em geral solventes eutéticos possuem maior viscosidade, em decorrência principalmente das fortes interações de hidrogênio entre os componentes, influenciando diretamente na transferência de massa e causando uma redução da mobilidade das moléculas (ZHANG *et al.*, 2012; QIN *et al.*, 2020). As densidades destes solventes também tendem a serem superiores à densidade da água, fator que pode estar atribuído à grande massa molecular (KUMAR *et al.*, 2015). Outros fatores que podem afetar a eficiência destes solventes é a adição de água e a temperatura, ambos são capazes de reduzir a viscosidade, mas a adição excessiva de água pode causar um enfraquecimento das ligações de hidrogênio (SAVI, 2019; ABBOTT *et al.*, 2004; DAI *et al.*, 2015).

3.7. Solventes eutéticos profundos naturais (NADES)

Os solventes eutéticos profundos naturais (NADES) são uma derivação dos DES. Denomina-se NADES quando os componentes destes solventes são metabólitos primários como açúcares, álcoois, ácidos orgânicos e sais quartenários de amônio naturais (CRAVEIRO *et al.*, 2016; FERNÁNDEZ, *et al.*, 2018). Dai e colaboradores (2013) demonstraram que a mistura de diversos metabólitos primários, quando misturados em proporções adequadas, são capazes de formar uma grande variedade de NADES. O cloreto de colina é um dos compostos que podem formar NADES com a maioria dos metabolitos primários existentes e, conseqüentemente, tem sido bastante utilizado no preparo da maioria dos solventes eutéticos profundos relatados na literatura (CRAVEIRO *et al.*, 2016). É notável que a escolha dos componentes é capaz de alterar algumas propriedades destes solventes. Em síntese, os NADES apresentam maior degradabilidade, menor custo, grande faixa de polaridade e facilidade de solubilização (SAVI, 2019; DAI *et al.*, 2013). Conforme visto, os NADES são alternativas consideradas ambientalmente mais seguras e têm sido muito empregados na extração de compostos naturais, para fins farmacêuticos (PAIVA *et al.*, 2014). Dentre os

compostos já extraídos utilizando NADES estão os ácidos fenólicos, alcaloides, pigmentos, açúcares e peptídeos (CHEMAT *et al.*, 2019).

3.7.1. Sistema de NADES

Uma das particularidades dos DES e NADES, é a capacidade de serem modelados ajustando suas propriedades a partir da seleção adequada dos componentes individuais, da proporção, da natureza química dos compostos e do teor de água adicionado (ZHANG *et al.*, 2012, SMITH; ABBOTT; RYDER, 2014).

O solvente verde utilizado nesta pesquisa é o NADES resultante da mistura equimolar entre cloreto de colina e ácido oxálico ([Ch]Cl:AO) e por isso considerado um solvente eutético profundo ácido. A colina é um cátion da família das vitaminas do complexo B e está presente no metabolismo humano (ZHAO; BAKER, 2012). Sua forma mais comum é como sal, como o cloreto de colina ou outros sais de colina. O [Ch]Cl é composto pelo ânion cloreto ligado ao cátion colina, sendo um dos sais mais utilizados durante a síntese dos DES principalmente por apresentar características como baixo custo, não toxicidade e fácil obtenção, além de ser considerado biodegradável. O ácido oxálico ou ácido etanodióico, é um ácido dicarboxílico, relativamente forte, encontrado naturalmente em muitos vegetais, leguminosas, cereais e frutas. Normalmente não é digerido pelo organismo, sendo expelido como excreta na urina.

Abbott e colaboradores (2004) apontaram para a potencialidade de DES formados pela mistura de cloreto de colina e ácidos carboxílicos como o ácido oxálico em alternativa aos solventes orgânicos e aos líquidos iônicos. Muitos trabalhos obtiveram bons resultados ao utilizar este NADES para a extração de produtos naturais, principalmente compostos fenólicos. Um exemplo é a extração de bioativos de *Hibiscus sabdariffa*, uma importante fonte de pigmentos naturais e outros compostos de valor agregado (ALANÓN *et al.*, 2020). Outros exemplos são a extração de reverastrol, um antioxidante natural (WANG *et al.*, 2021) e de antocianinas a partir da biomassa de mirtilo (FU *et al.*, 2021).

Apesar das características dos DES/NADES serem influenciadas por seus constituintes, a não toxicidade e biodegradabilidade não necessariamente são reflexo unicamente dos compostos químicos que o integram. Dessa forma alguns DES podem ser mais tóxicos ou menos se comparados aos produtos químicos puros utilizados na mistura, devido ao efeito sinérgico ou de aditividade (VAN OSCH *et al.*, 2015).

3.7. Extração assistida por micro-ondas (MAE)

De maneira corrente, o processo de extração de biocompostos é realizada por meio de técnicas convencionais como maceração e Soxhlet. No entanto, para tentar superar desvantagens como uso de solvente orgânico em excesso, tempo de processo, alternativas mais eficientes como a extração assistida por micro-ondas têm sido propostas (do inglês *microwave assisted extraction* - MAE) (BENER *et al.*, 2016; SROGI, 2006).

A técnica MAE utiliza radiações não ionizantes para induzir o movimento molecular gerando energia, que age diretamente na molécula por meio de condução iônica e rotação de dipolos (ZLOTORZYNSKI, 1995). Dentre as vantagens deste procedimento têm-se redução do tempo de extração, menor gasto de solvente, maior rendimento e consequente redução de resíduos, além de alta reprodutibilidade (BENER *et al.*, 2016; YUNPU *et al.*, 2016). Entretanto, altas potências podem favorecer a degradação de compostos (SROGI, 2006).

Para um maior rendimento da extração com solventes eutéticos, o aumento da temperatura pode ser necessário para reduzir a alta viscosidade dos DES. Por isso, métodos de extração que associam aquecimento podem ser preferíveis. Assim a extração assistida por micro-ondas pode trazer benefícios ao reunir aquecimento e eficiência (WANG *et al.*, 2020). As micro-ondas são capazes de penetrar no interior de moléculas orgânicas, principalmente naquelas com cadeias majoritariamente polares, uma vez que materiais polares tendem a absorver maior energia de micro-ondas, reduzindo o tempo de reação e resultando em uma maior taxa de reação (YUNPU *et al.*, 2016). Neste contexto, essa técnica pode ser empregada na extração de variados produtos naturais de plantas (WANG *et al.*, 2020).

3.8. Planejamento e otimização de experimentos

O processo de extração pode ser afetado simultaneamente por uma série de variáveis experimentais, também chamadas de fatores. Idealmente, variar todos os fatores estudados ao mesmo tempo é mais eficiente para o processo que uma análise univariada, a razão para isso está em um comportamento denominado interação entre fatores, ou seja, em geral, as variáveis de um experimento podem se influenciar mutuamente e o valor ideal para uma delas ser dependente do valor de outra, (BARROS NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2001).

Além de não detectar a interação entre as variáveis, a otimização univariada exige mais experimentos, não é capaz de prever o que pode acontecer em um experimento não testado, além de não ser possível ter uma ideia prévia de quantos experimentos serão necessários para alcançar o objetivo proposto. Nota-se que as análises multivariadas são mais

eficientes principalmente no dia a dia industrial, no entanto apresenta algumas desvantagens como maior complexidade no tratamento estatístico dos dados, além de poder exigir etapas preliminares de experimentos para conhecer as variáveis consideradas influenciadoras do processo, procedimento denominado triagem (LUNDSTEDT *et al.*, 1998).

Quando vários fatores são de interesse em um experimento, um planejamento fatorial pode ser usado, a fim de que esses fatores sejam variados conjuntamente, assim um planejamento fatorial nada mais é que o arranjo de combinação de experimentos possíveis, considerando os níveis das variáveis investigadas (MONTGOMERY; RUNGER, 2003).

Baseada em planejamentos fatoriais, a Metodologia de Superfície de Resposta (ou RSM- *Response Surface Methodology*) é uma coleção de técnicas matemáticas e estatísticas muito utilizadas quando o objetivo principal do pesquisador é otimizar o sistema, de forma a maximizar ou minimizar algum tipo de resposta (propriedade de interesse), como por exemplo aumentar o rendimento de uma extração (BARROS NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2001, p.2, p.251; MONTGOMERY; RUNGER, 2003, p.336).

Basicamente, a RSM possui duas etapas distintas, a modelagem e o deslocamento, que atuam com o objetivo de atingir uma região ótima da superfície investigada, ou seja, baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos a partir do ajuste de funções polinomiais, geralmente lineares ou quadráticas, das respostas obtidas com planejamentos fatoriais a fim de se obter o caminho em que a resposta varie de forma mais pronunciada (BARROS NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2001; MONTGOMERY; RUNGER, 2003; BOX; WILSON, 1978).

Se a resposta for bem modelada por uma função linear das variáveis, então essa função será um modelo de primeira ordem como exemplifica a equação 2:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \epsilon \quad (2)$$

Em que x representa as variáveis codificadas, para um modelo com k variáveis, a interseção β_0 corresponde à média global de todas as observações, $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$ os coeficientes da regressão linear, que correspondem à metade da estimativa dos efeitos das variáveis e ϵ o componente erro aleatório.

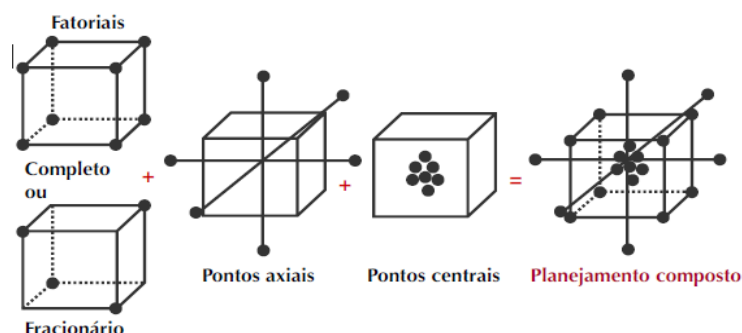
Caso contrário, o sistema pode ser ajustado a uma função polinomial de maior grau, como o modelo de segunda ordem, apresentado na equação geral (equação 3):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_i \sum_{\substack{j \\ i < j}} \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon \quad (3)$$

Em que o número de variáveis vai de i a k e ij representa as interações entre as variáveis.

Dos planejamentos disponíveis, o planejamento composto central ou CCD (Central Composite Design), é um dos mais considerados para ajustar modelos de superfície de resposta devido à eficiência com respeito ao número de experimentos necessários (MONTGOMERY; RUNGER, 2003). Além disso, este modelo permite verificar a curvatura de um plano, já que é capaz de realizar um ajuste polinomial e verificar a existência de termos quadráticos na regressão (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Em geral esse modelo é composto por um conjunto de experimentos que incluem pontos fatoriais (2^k), axiais ou estrelas ($2k$) e centrais (número arbitrário de repetições, em média 1 a 5), onde k corresponde ao número de fatores. A Figura 10 mostra a composição da região de estudo de um CCD com 3 variáveis (fatores).

Figura 10 - Demonstração da formação de um Planejamento Composto Central para 3 fatores ($k=3$)



Fonte: Adaptado de MONTGOMERY; RUNGER, 2003.

Observando a Figura 10 é possível notar a maior abrangência deste modelo com relação à região de interesse estudada, se comparada ao planejamento fatorial. Este estudo optou por um planejamento composto central rotacional (CCRD), assim denominado, pois neste modelo estima-se que o desvio padrão da resposta prevista seja constante nos pontos que estiverem à mesma distância do centro do planejamento. Este conceito de rotabilidade proposto por Box e Hunter (1957) define o valor de α (níveis axiais) para os pontos axiais de um planejamento 2^k (2 níveis, com k fatores) e pode ser calculado a partir da seguinte equação 4:

$$\alpha = (2^k)^{1/4} \quad (4)$$

Para um CCRD 2^3 , o valor de α corresponde a 1,682. Ademais, é relevante para um planejamento experimental construído a partir de um modelo empírico ser considerado

adequado para um sistema, ser capaz de proporcionar boas estimativas para os coeficientes e apresentar condições de avaliá-lo quanto a termos como regressão e falta de ajuste (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

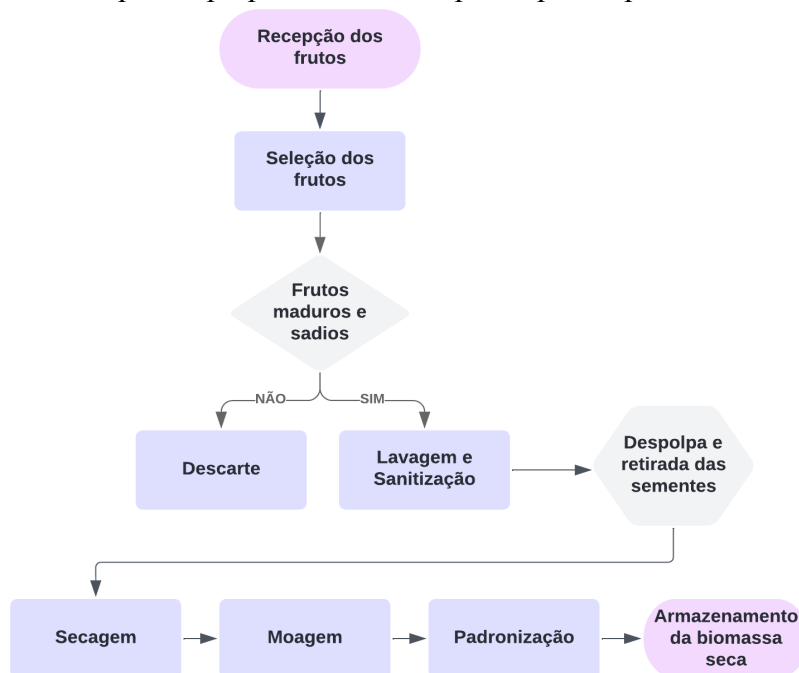
Neste capítulo estão apresentados os materiais e métodos utilizados durante o desenvolvimento deste trabalho, realizado majoritariamente no Laboratório de Processos Biotecnológicos (PROTEC) do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa.

4.1. Matéria Prima

Os frutos de bacupari, da espécie *G. gardneriana*, utilizados neste estudo foram coletados na cidade de Viçosa, gentilmente cedidos e identificados pelo Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Os frutos passaram por uma pré-seleção para serem utilizados aqueles que estivessem sadios e em processo de maturação. Assim, os bacuparis selecionados seguiram para a etapa de higienização, na qual foram lavados em água corrente e enxugados. A polpa foi separada das sementes com o auxílio de uma faca e de uma peneira (com tela de arame galvanizado) para facilitar a remoção das fibras da polpa aderidas à semente. As sementes foram lavadas e colocadas para secar em local ventilado, à temperatura ambiente, por um período de 5 a 7 dias até que sua massa permanecesse constante. Para a redução granulométrica da amostra, utilizou-se um processador de alimentos (liquidificador). Após a moagem, a biomassa seca foi tamisada para padronizar o tamanho a uma faixa de 24 a 28 *mesh* (SILVA, 2019), e armazenada em dessecador até o uso. O fluxograma da Figura 11 resume as etapas.

Figura 11 - Etapas de preparo da matéria prima para o processo de extração



Fonte: Autoria própria.

4.2. Reagentes

Os padrões isolados de Fukugetina (FUK), Guttiferona-A (GUT) e 7-Epiclusianona (EPI) foram cedidos pelo Prof. Marcelo Henrique dos Santos (UFV). A Tabela 6 elenca os reagentes utilizados nesta pesquisa: os compostos utilizados para preparação do NADES, os solventes convencionais testados, bem como os reagentes utilizados para as análises de avaliação do potencial do extrato e quantificação de moléculas.

Tabela 6 - Lista de reagentes

Reagente	Grau de Pureza	Marca
Cloreto de Colina	98,0%	Sigma-Aldrich
Ácido Oxálico	99,0%	Sigma-Aldrich
Etanol	99,8% P.A	Cromoline
Acetato de Etila	P.A	Impex
Metanol	Grau HPLC	Dinâmica
Quercetina	-	Sigma- Aldrich
Cloreto de alumínio hexahidratado	P.A	Dinâmica
Acetato de potássio	-	Êxodo Científica
Ácido gálico	P.A –ACS	Riedel-deHaen
Reagente de Folin-Ciocalteu	2M	Êxodo Científica

Carbonato de sódio anidro	P.A ACS	Êxodo Científica
Acetonitrila	Grau HPLC	Sigma-Aldrich
Ácido orto-fosfórico	85,0%	Cinética
DPPH	-	Sigma- Aldrich

4.2.1. Preparo dos NADES

O NADES utilizado no processo de extração foi uma mistura de Cloreto de Colina como HBA e Ácido Oxálico como HBD, na proporção molar 1:1. O procedimento adotado para preparação do NADES consistiu em misturar as quantidades adequadas de HBA e HBD em um frasco de vidro e aquecê-lo em banho de glicerina a 80 °C, sob agitação magnética em recipiente fechado até a formação de um líquido homogêneo e clarificado (cerca de 60 minutos) (CUI *et al.*, 2021). O solvente produzido foi armazenado em recipiente hermético e mantido em dessecador até o uso.

4.3. Planejamento experimental

Para analisar o comportamento das variáveis de forma multifatorial, a otimização da extração de semente de bacupari com DES [Ch]Cl:AO foi realizada utilizando um delineamento composto central rotacional (CCRD) de cinco níveis e três variáveis em função da concentração dos compostos FUK, GUT e EPI. O CCRD compreendeu um conjunto de 17 experimentos, sendo 8 pontos fatoriais (+1 e -1), 6 pontos axiais (+ α e - α) e 3 repetições no ponto central. As variáveis analisadas foram temperatura (°C), concentração de biomassa (% m/v) e quantidade de água adicionada ao solvente (% v/v). A variável resposta foi a concentração das biomoléculas avaliada via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A Tabela 7 relaciona os níveis e as variáveis testadas neste planejamento e a Tabela 8 representa a matriz de contraste dos coeficientes codificados e decodificados do delineamento proposto, ou seja, as condições experimentais de cada ensaio.

Tabela 7 - Variáveis e seus níveis empregados em um Planejamento Composto Central

Variáveis	Níveis				
	-1,68 (- α)	-1	0	1	1,68 (α)
Temperatura de extração (°C)	25	35	50	63	75

Razão biomassa/solvente (%m/v)	5	10	17,5	25	30
Fração de água/solvente (%)	0	12	31	50	63

Tabela 8 - Matriz de contraste dos coeficientes do CCRD a 3 variáveis para a extração utilizando NADES

Variável		Decodificada		Codificada		
Ensaio	Temperatura (°C)	[Biomassa] (%m/v)	Fração de água (v/v)	Temperatura (°C)	[Biomassa] (%m/v)	Fração de água (v/v)
1	35	10	12	-1	-1	-1
2	65	10	12	1	-1	-1
3	35	25	12	-1	1	-1
4	65	25	12	1	1	-1
5	35	10	50	-1	-1	1
6	65	10	50	1	-1	1
7	35	25	50	-1	1	1
8	65	25	50	1	1	1
9	25	17,5	31	-1,68	0	0
10	75	17,5	31	1,68	0	0
11	50	5	31	0	-1,68	0
12	50	30	31	0	1,68	0
13	50	17,5	0	0	0	-1,68
14	50	17,5	63	0	0	1,68
15	50	17,5	31	0	0	0
16	50	17,5	31	0	0	0
17	50	17,5	31	0	0	0

Os experimentos foram realizados em ordem randômica para minimizar variações na resposta devido a fatores externos. Os efeitos de cada variável foram calculados, bem como os coeficientes e erros atribuídos. Utilizou-se teste t de Student para a determinação dos parâmetros estatísticos da regressão a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4.4. Procedimento de extração

Em um tubo de vidro foi adicionado a bioamassa seca e o solvente. Em seguida, este tubo foi tampado e acoplado em um equipamento sintetizador de micro-ondas (CEM

Discover System 908005), configurado para realizar a extração a uma potência de 30 W, durante 6 minutos (acrescido tempo de rampa de 2 minutos, quando necessário) e na temperatura exigida por cada ensaio especificado na Tabela 8. Após o término da extração, os extratos foram centrifugados por cerca de 5 minutos a uma velocidade de 3000 rpm, para facilitar a deposição da biomassa. Em seguida com a ajuda de uma pipeta, o extrato bruto foi coletado e armazenado em tubos eppendorfs até seguir para as etapas de caracterização da amostra. A Figura 12 ilustra, de forma geral, o passo a passo para obtenção dos extratos.

Figura 12 - Esquema do processo de extração assistida por micro-ondas, utilizando NADES



Fonte: Autoria própria.

A partir dos dados presentes em literatura, optou-se por comparar extratos selecionados de NADES [Ch]Cl:AO, com extratos obtidos a partir de solventes convencionais comumente usados em extrações de biocompostos. Dessa forma, considerando a biomassa utilizada (sementes de bacupari), foram selecionados os solventes: acetato de etila, etanol e água para avaliar o potencial extrator do solvente verde proposto neste estudo (SAMARÃO *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2019), tendo em vista que são solventes de menor perfil toxicológico dentre os utilizados em extrações de compostos vegetais e, também considerados mais “verdes” que outros solventes. Com exceção da água que é completamente atóxica.

A extração com solventes convencionais ocorreu após análise dos dados do planejamento experimental, pois a concentração de biomassa utilizada na extração com estes solventes correspondeu à razão que resultou em maior rendimento de extração para o NADES. A metodologia de extração aplicada aos solventes convencionais foi a mesma para os solventes verdes. Foram utilizados os solventes puros e a temperatura foi mantida próxima

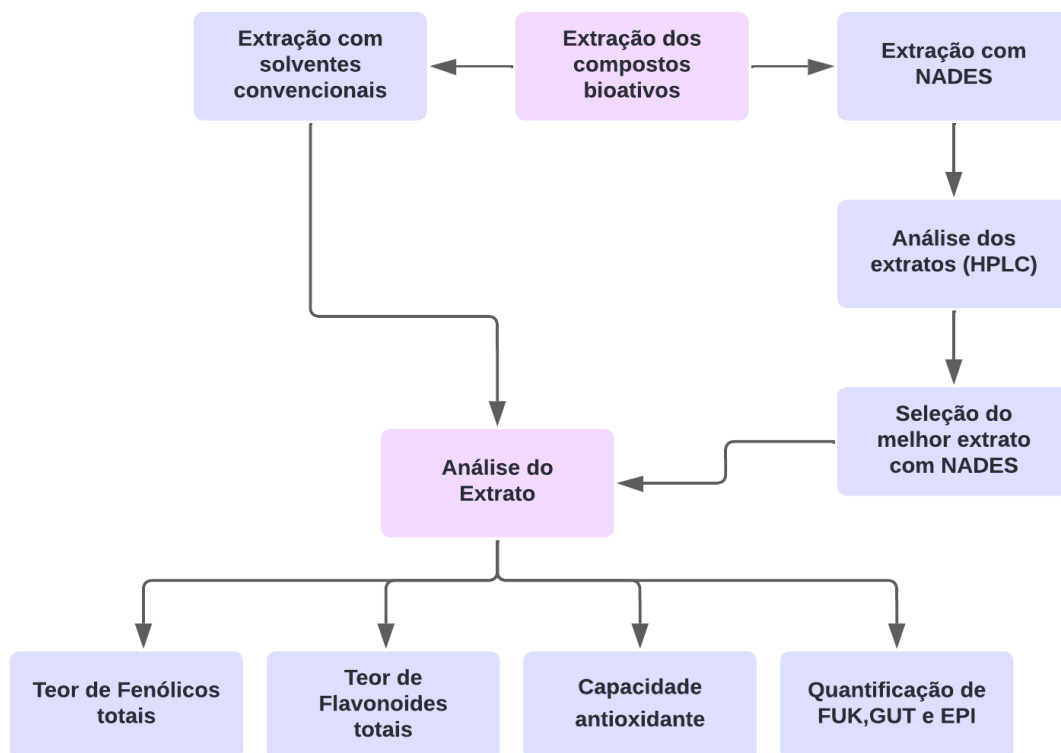
à temperatura ambiente (30 °C) conforme usualmente realizado nos trabalhos de extração com sementes de *G. gardneriana* presentes na literatura (SAMARÃO *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2019).

4.5. Caracterização do extrato

Os extratos selecionados para caracterização foram: um extrato utilizando NADES à temperatura ambiente, o extrato correspondente ao ensaio que alcançou maior rendimento no planejamento experimental, o extrato nas condições consideradas ótimas pelo modelo estatístico, e os extratos utilizando os solventes convencionais (etanol, acetato de etila e água).

Estes extratos passaram por quantificação por cromatografia líquida dos compostos ditos majoritários: Fukugetina, Guttiferona e 7-Epiclusianona (RODRIGUES, 2019), análise do teor de fenólicos e flavonoides e atividade antioxidante. A Figura 13 a seguir exibe uma visão geral da sequência dos processos realizados para análise dos extratos.

Figura 13 - Visão geral das etapas realizadas após a extração assistida por micro-ondas



Fonte: Autoria própria.

4.5.1. Determinação de compostos fenólicos totais

A concentração de compostos fenólicos totais foi avaliada segundo a metodologia proposta por Singleton e Rossi (1965) adaptada por Lazzarotto *et al* (2020) utilizando reagente de Folin-Ciocalteu. Para a leitura das amostras, construiu-se uma curva analítica com ácido gálico (50 mg. L⁻¹ - 450 mg. L⁻¹). Adicionou-se em tubos de ensaio: 20 µL de extrato diluído em água (para a curva analítica, o extrato foi substituído por solução padrão de ácido gálico), 100 µL de reagente de Folin-Ciocalteu e 1,58 mL de água destilada. Essa amostra foi mantida em repouso por cerca de 6 minutos e em seguida foram adicionados 300 µL de solução de Na₂CO₃ (200 g. L⁻¹) e a amostra mantida novamente em repouso por 2 horas ao abrigo de luz. Após esse período de incubação, deu-se a leitura em comprimento de onda 765 nm em espectrofotômetro de UV-Vis (UV mini-1240 SHIMADZU), em cubeta de quartzo. Considerou-se o branco como a amostra contendo todas as soluções mencionadas, exceto o extrato ou padrão. Toda a análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos em mg de ácido gálico por mL de extrato (mgAG.mL⁻¹extrato). Em caso de necessidade de armazenar as soluções, a solução de Na₂CO₃ e a solução estoque de ácido gálico podem ser refrigeradas, revestidas de papel alumínio ou em frasco âmbar, por um curto prazo de tempo.

4.5.2. Determinação de flavonóides

Para a determinação de flavonoides totais foi empregado método colorimétrico com cloreto de alumínio (PROMMUAK; DE-EKNAMKUL; SHOTIPRUK, 2008). A quantificação foi obtida por meio da construção de uma curva analítica com padrão de quercetina diluída em etanol 80%, com concentrações variando de 5 mg. L⁻¹ a 150 mg. L⁻¹. Água destilada foi usada como o branco para as análises. Em tubos de ensaio foram adicionados 0,5 mL de solução padrão ou de extrato diluído, 1,5 mL de etanol 95%, 0,1 mL de solução de cloreto de alumínio (AlCl₃ 10 % m/v), 0,1 mL de acetato de potássio 1M e 2,8 mL de água destilada. Essa amostra foi mantida incubada por 30 minutos ao abrigo da luz, a temperatura ambiente. Após esse tempo, as leituras foram realizadas em comprimento de onda igual a 415 nm, em espectrofotômetro UV-Vis (UV mini-1240 SHIMADZU) com cubeta de quartzo. Foram realizadas triplicatas de todas as amostras e os resultados expressos em mg de ácido gálico por mL de extrato (mgAG.mL⁻¹extrato).

4.5.3. Estudo *in vitro* da atividade sequestradora de radicais livres (DPPH)

A capacidade antioxidante dos extratos brutos selecionados foi determinada usando o radical livre DPPH, conforme metodologia proposta por Brand-Wiliams, Cuvelier e Berset (1995) e adaptada por Rufino e colaboradores (2007). A amostra a ser analisada em espectrofotômetro (UV mini-1240 SHIMADZU) consistiu em 0,1 mL de amostra diluída em água (1:5 v/v) adicionada a 3,9 mL de solução de DPPH (60µM). O decréscimo da absorbância foi monitorado em comprimento de onda 515 nm de tempos em tempos até a reação estabilizar e consequentemente o valor da absorbância manter-se inalterado ou até atingir o tempo de 1 hora de análise. A concentração inicial exata média de DPPH na reação foi calculada pela curva de calibração de DPPH e determinada pela regressão linear da curva obtida. As amostras foram mantidas ao abrigo da luz durante toda a análise. Como branco para a amostra utilizou-se metanol. Além disso, foram preparadas amostras controle, que consistiam em amostras ausentes de matéria antioxidantes, ou seja, contendo apenas uma alíquota do solvente de cada extração e a solução de DPPH. Para calcular o percentual de DPPH consumido, também denominado de percentual de atividade antioxidante (%AA), foram utilizadas as leituras de absorbância no tempo de 30 minutos para os extratos escolhidos a partir da equação 5:

$$\%AA = 100 - \left[\frac{(ABS_{amostra} - ABS_{branco})}{ABS_{controle}} \right] \times 100 \quad (5)$$

Em que $ABS_{amostra}$ corresponde à absorbância da amostra, a absorbância do branco como ABS_{branco} , e $ABS_{controle}$ como a absorbância do controle (OLIVEIRA, 2015).

4.5.4. Cromatografia líquida de alta eficiência com detector-UV

Para comparação dos extratos brutos obtidos, testes cromatográficos foram feitos para quantificação das concentrações de Fukugetina, Guttiferona-A e 7-Epiclusianona nas amostras a partir de uma análise em cromatógrafo líquido de alta eficiência-HPLC (modelo LC Workstation CLASS LC-10, Shimadzu), com detecção por espectroscopia UV-Vis. A análise utilizou coluna de fase reversa C18 (Retek, 150 mm × 4,6 mm). A fase móvel consistiu numa solução de acetonitrila e água acidificada (0,5% de ácido ortofosfórico) na proporção 80:20 v/v, no método isocrático, o comprimento de onda utilizado foi de 254nm e fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ (RODRIGUES, 2019).

Para quantificação dos compostos majoritários, foi construída uma curva padrão para cada biocomposto de interesse. Os padrões foram injetados isoladamente para identificar os

tempos de retenção dos compostos. Para a Fukugetina, as concentrações variaram de 5,0 mg. L⁻¹ a 250,0 mg.L⁻¹, para GUT de 2,0 mg.L⁻¹ a 100,0 mg.L⁻¹ e EPI DE 1,0 mg.L⁻¹ a 150,0 mg.L⁻¹, todas as diluições foram feitas em acetonitrila. Em seguida, identificou-se nos extratos o tempo de retenção dos padrões para a otimização cromatográfica.

As amostras dos extratos foram preparadas a partir de 40 µL de extrato bruto adicionados em balão volumétrico de 5 mL e o volume completado com metanol P.A. Após esta fase, esse extrato diluído foi filtrado em filtro de membrana PVDF 0,45µm e 20µL desta amostra foi injetado no cromatógrafo para obtenção dos perfis cromatográficos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As imagens da Figura 14 retratam a aparência do bacupari utilizado nesta pesquisa, enquanto nas imagens da Figura 15 visualizam-se as sementes secas, antes e depois de serem trituradas.

Figura 14 - Fruto do bacupari (*Garcinia gardneriana*)



Fonte: Autoria própria.

Figura 15 - Semente seca do bacupari e após a cominuição



Fonte: Autoria própria.

Sabe-se que a umidade possibilita a ação enzimática e facilita a contaminação microbiológica da matéria. A fim de analisar a estabilidade da matéria prima quanto à absorção de umidade, algumas sementes foram separadas para a realização de pesagens periódicas durante um período de 24 horas de secagem em estufa. O procedimento foi realizado em triplicata (replicatas R1, R2, R3), em que cada replicata consistiu na massa média entre 3 sementes.

A Tabela 9 apresenta os valores médios da massa total m_t (massa inicial da semente), a massa final da semente m_s (massa seca) e a massa de água m_a , em que a massa de água é o resultado da subtração entre a massa inicial da semente e a massa final.

Tabela 9 - Massa das sementes antes e após o processo de secagem e massa de água perdida no em cada replicata

Replicata	Massa total (g)	Massa seca (g)	Massa de água (g)
R1	2,8807 ±0,0001	2,2978 ±0,0001	0,5829 ±0,0001
R2	3,1532 ±0,0001	2,3683 ±0,0001	0,7849 ±0,0001
R3	3,2977 ±0,0001	2,3960 ±0,0001	0,9017 ±0,0001

De posse dos valores de massa total (m_t) e de massa seca (m_s), foi possível avaliar o teor de umidade médio da semente, em base úmida e em base seca.

Conteúdo de umidade médio em base úmida (X'), em porcentagem:

$$X' = \frac{m_a}{m_t} \times 100\% \quad (6)$$

Conteúdo de umidade médio em base seca (X), em porcentagem:

$$X = \frac{m_a}{m_s} \times 100\% \quad (7)$$

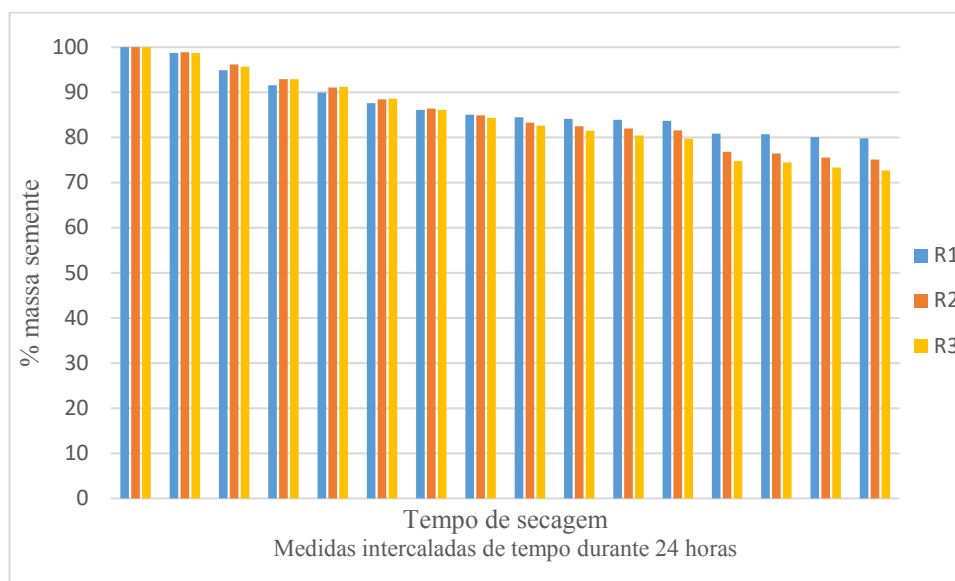
A Tabela 10 relaciona os valores encontrados para o conteúdo de umidade livre da semente de bacupari para cada replicata.

Tabela 10 - Conteúdo de umidade livre da semente de bacupari em base úmida (X') e em base seca (X)

Replicata	X' (%)	X (%)
R1	20,23	25,37
R2	24,89	33,14
R3	27,34	37,63
Valor médio	24,15 ±2,949	32,04±5,064

A Figura 16 apresenta a porcentagem de decaimento da massa da semente para cada replicata em função do tempo de secagem.

Figura 16 - Porcentagem de decréscimo da massa de semente durante o período de secagem



Observando a Figura 16, verifica-se que a matéria prima perdeu cerca de 20 a 30% de umidade, conforme observado também pelos dados da Tabela 10, durante o período de secagem até a estabilização, apresentando uma perda de umidade lenta e gradual. Após este teste e durante todo o estudo, observou-se que as sementes secas suportam o acondicionamento, tendo em vista que não sofreram alterações significativas mesmo durante o tempo sem análises na pandemia.

5.1. Otimização da extração de biocompostos de semente de bacupari usando DES

Um CCRD foi usado para avaliar a influência dos três fatores:

- Temperatura de extração;
- Concentração de biomassa;
- Razão de água adicionada ao DES.

Na extração assistida por micro-ondas de compostos bioativos presentes no bacupari, mais especificamente das biomoléculas Fukugetina (FUK), Guttiferona-A (GUT) 7-Epiclusianona (EPI) para o NADES [Ch]Cl:AO.

A escolha dos níveis +1 e -1 das variáveis orientou-se da máxima estatística de que é necessária uma interação entre processo, estatística e bom senso. Dessa forma, foram testadas quantidades de sólido/solvente que evitassem a saturação do solvente, temperaturas médias de

processo, a fim de tornar a escala do processo em bancada para a indústria mais exequível e reduzir os custos da extração.

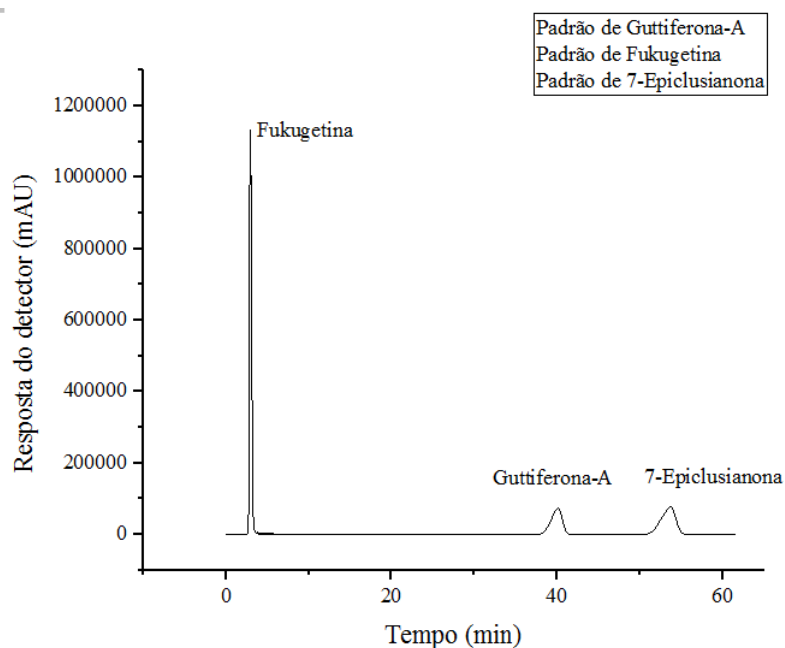
A concentração dos compostos bioativos FUK, GUT e EPI foi quantificada via cromatografia líquida de alta eficiência. Para isso, curvas analíticas foram construídas utilizando concentrações distintas de padrão conforme discorrido no tópico 4.6.4 deste trabalho, considerando a relação linear entre a área do pico (y) e a concentração (x). A identificação dos compostos nos cromatogramas ocorreu a partir da comparação entre os tempos de retenção dos compostos padrões isolados (Figura 17) e o tempo dos picos apresentados nos perfis dos extratos brutos. A Tabela 11 a seguir expõe a equação obtida para cada composto, o coeficiente de determinação (R^2) e os tempos de retenção (t_R).

Tabela 11 - Equação da reta de ajuste linear das curvas analíticas dos compostos padrões Fukugetina, Guttiferona-A e 7-Epiclusianona e respectivos tempos de retenção obtidos após análise HPLC

Composto	Equação	R^2	t_R (min)
FUK	$y = 42680x + 14896$	0,9984	2,5
GUT	$y = 15070x + 23404$	0,9894	37,3
EPI	$y = 17973x + 90615$	0,9918	53,6

A Figura 17 apresenta a sobreposição dos cromatogramas dos padrões de Fukugetina, Guttiferona-A e 7-Epiclusianona, obtido nas condições de análise descritas em metodologia (Tópico 4.5.4 do presente trabalho).

Figura 17 - Cromatograma dos padrões dos compostos Fukugetina ($t_R = 2,5$ min), Guttiferona-A ($t_R = 37,3$ min) e 7-Epiclusianona ($t_R = 53,6$ min) em comprimento de onda de 254 nm



Os resultados do rendimento de extração dos biocompostos com NADES para os ensaios do CCRD 2³, obtidos por quantificação cromatográfica, foram dispostos na Tabela 12, além da especificação dos níveis e fatores decodificados de cada ensaio. Os experimentos foram realizados de maneira randômica visando a reduzir erros sistemáticos. Todas as extrações foram assistidas por micro-ondas, com duração de 6 minutos cada.

Este tempo de extração foi pré-estabelecido em testes preliminares. Nestes testes, amostras com a mesma quantidade de semente moída (10% m/v) e solvente (NADES puro) foram submetidas à MAE por tempo de extração de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 minutos e levadas para análise em HPLC, em triplicata, para avaliar qual tempo obteve maior concentração de compostos fenólicos. Após esta avaliação, notou-se que em 6 minutos, houve um pico máximo de concentração. Em geral, tempos maiores de extração apresentam efeito positivo no rendimento, entretanto notou-se uma queda de rendimento após determinado período (6 min), fato que alguns estudiosos atribuem à degradação dos compostos em decorrência da exposição térmica após determinado período de tempo (DOLDLOVA *et al.*, 2021). Esperava-se um tempo de extração relativamente curto tendo em visto que o MAE, em comparação a outras técnicas convencionais de extração, possibilita um alto rendimento de extração em tempos menores.

Tabela 12 - Concentração dos compostos Fukugetina, Guttiferona-A e 7-Epiclusianona em extrato bruto de semente de bacupari, com NADES como solvente extrator, segundo ensaios do CCRD 2³

Ensaio	Temperatura (°C)	[Biomassa] (%m/v)	Fração de água (%v/v)	[FUK] (g.L ⁻¹)	[GUT] (g.L ⁻¹)	[EPI] (g.L ⁻¹)
1	35	10%	12%	8,33	-	-
2	65	10%	12%	14,36	-	-
3	35	25%	12%	12,00	-	-
4	65	25%	12%	15,85	-	-
5	35	10%	50%	6,90	-	-
6	65	10%	50%	7,99	0,76	-
7	35	25%	50%	9,23	0,11	-
8	65	25%	50%	9,56	0,70	-
9	25	18%	31%	7,35	0,30	-
10	75	18%	31%	12,60	1,30	-
11	50	5%	31%	10,64	-	-
12	50	30%	31%	15,36	-	-
13	50	18%	0%	15,55	0,93	-
14	50	18%	63%	6,57	-	-
15	50	18%	31%	10,41	-	-
16	50	18%	31%	10,79	-	-
17	50	18%	31%	11,00	-	-

Para construção e ajuste do modelo, os dados codificados das variáveis foram utilizados para fins de cálculo da regressão e obtenção do modelo matemático com o auxílio do software estatístico STATISTICA® 7.0, sendo utilizada uma análise de variância (ANOVA) para estimar os parâmetros estatísticos.

5.1.1. Otimização da extração de Fukugetina

Para a Fukugetina, verifica-se que o modelo construído foi adequado, a um nível de confiança de 95%, uma vez que os efeitos apontam para a relação significativa entre a concentração do composto bioativo e os fatores testados. Os efeitos de cada variável, bem como os efeitos das interações entre elas foram calculados e expressos na Tabela 13. A adição de água destilada ao DES é a variável que mais afetou a extração de FUK, seguida da temperatura e depois da concentração de biomassa, entretanto com suave variação entre estes

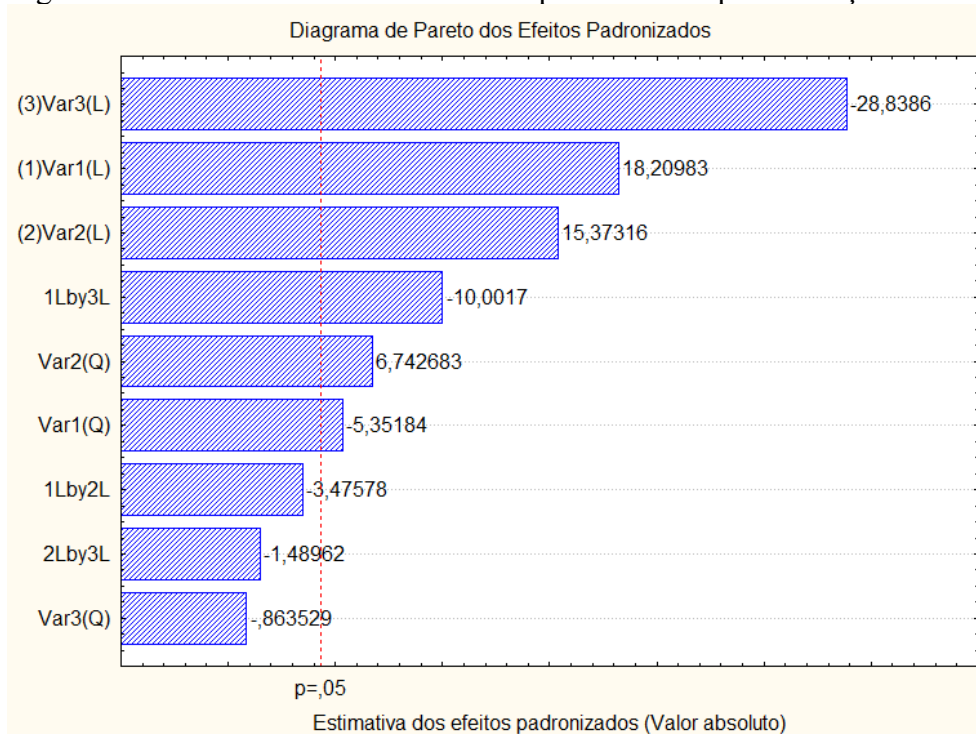
valores. O efeito da interação entre temperatura e porcentagem de água no solvente também foi significativo, enquanto as demais interações de segunda ordem não foram significativas na região estudada no delineamento. Ademais, verifica-se que os termos dos efeitos de fração de água são negativos, indicando que existe um valor máximo de água a ser adicionada ao solvente para que a extração seja viável. Na Tabela 13 destacam-se em negrito, os efeitos que foram estatisticamente significativos, a um nível de significância $p=0,05$, sendo os demais sem importância estatística. Esta tabela também apresenta o erro padrão, a estatística t e o valor de p calculado para o teste estatístico.

Tabela 13 - Estimativa dos efeitos para o planejamento CCRD 23 para a extração do biocomposto Fukugetina por NADES

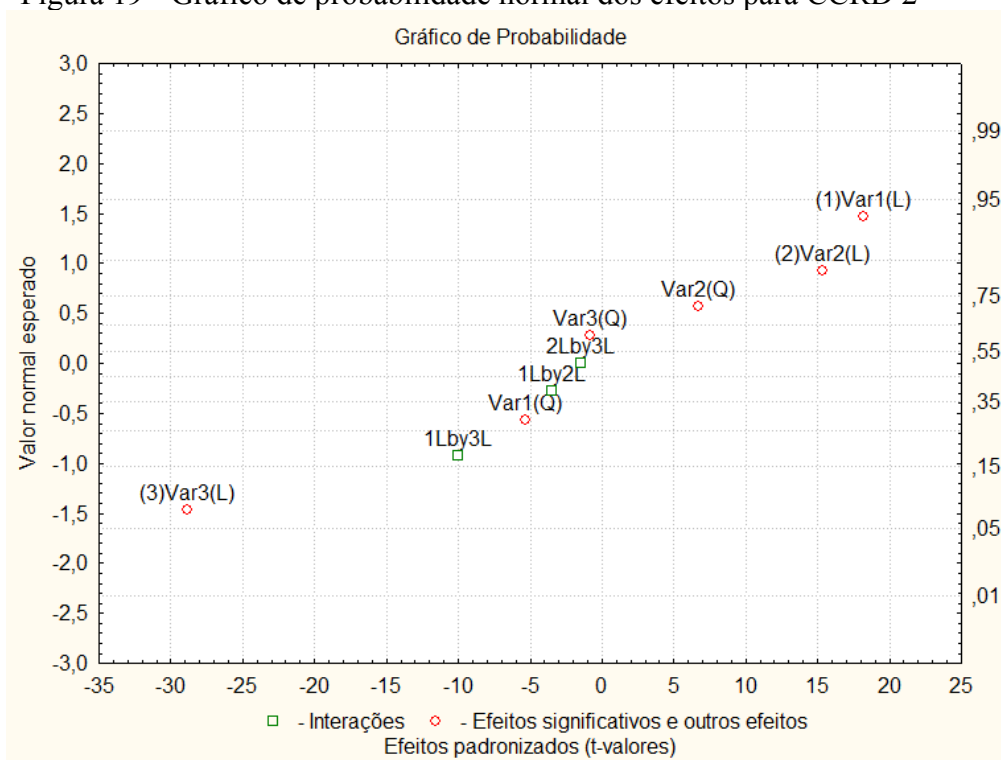
	Variável	Efeito	Erro padrão	t(7)	p
-	Intercepto	10,82202	0,172002	62,9182	0,000253
Var1(L)	Temperatura (L)	2,95820	0,162450	18,2098	0,003002
Var 1 (Q)	Temperatura (Q)	-0,96377	0,180082	-5,3518	0,033185
Var2 (L)	Concentração de biomassa (L)	2,49738	0,162450	15,3732	0,004205
Var2 (Q)	Concentração de biomassa (Q)	1,21423	0,180082	6,7427	0,021295
Var3 (L)	Fração de água % (L)	-4,69698	0,162871	-28,8386	0,001200
Var3 (Q)	Fração de água % (Q)	-0,15681	0,181598	-0,8635	0,478863
1L by 2L	Interação Temp x [biomassa]	-0,73500	0,211463	-3,4758	0,073736
1L by 3L	Interação Temp x %água	-2,11500	0,211463	-10,0017	0,009849
2L by 3L	Interação [biomassa] x %água	-0,31500	0,211463	-1,4896	0,274775

A partir dos dados descritos na Tabela 13, observa-se que o modelo apresenta parâmetros lineares e quadráticos significativos, apesar dos valores dos coeficientes lineares serem de maior magnitude que os valores dos coeficientes quadráticos, um ajuste de um modelo quadrático para a resposta rendimento de extração de fukugetina ([FUK]) seria mais adequado para que essa influência polinomial seja considerada na equação ajustada ao modelo. O diagrama de Pareto, representado na Figura 18, evidencia os valores absolutos dos efeitos padronizados desde o maior até o menor efeito. O gráfico traça uma linha de referência para identificar quais efeitos foram estatisticamente significativos, linha esta que representa o nível de significância estatística ($p=0,05$). Assim todos os fatores que ultrapassam esta linha interferem no rendimento do biocomposto em análise.

Figura 18 - Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para extração de fukugetina



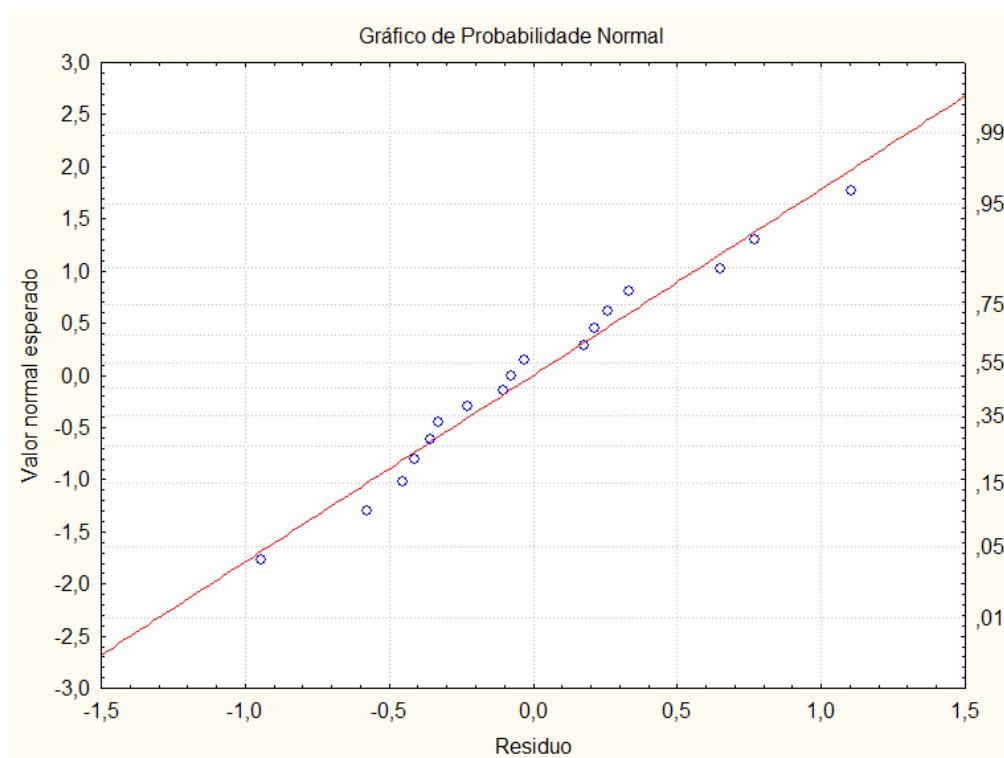
Conforme apresentado, os parâmetros lineares: fração de água no solvente- Var3(L), Temperatura de extração -Var1(L), Concentração de biomassa -Var2(L) e interação entre temperatura e fração de água (1Lby3L) apontam, nesta ordem de influência, para uma variação linear da resposta. As variáveis: concentração de biomassa- Var2(Q) e temperatura-Var1(Q) também apresentaram parâmetros quadráticos significativos. A partir do Diagrama de Pareto inferem-se quais dos efeitos são maiores. No entanto, como este gráfico exibe o valor absoluto, não é possível determinar quais efeitos maximizam ou minimizam a resposta. No gráfico de probabilidade dos efeitos destacado na Figura 19 é possível examinar essa magnitude e direção destes efeitos. Este gráfico mostra os efeitos em relação a uma linha de ajuste de distribuição em que o efeito é 0 (eixo $x=0$). Efeitos mais afastados deste eixo tem maior magnitude, também é possível avaliar quais os efeitos contribuem positiva ou negativamente para o aumento da resposta.

Figura 19 - Gráfico de probabilidade normal dos efeitos para CCRD 2³

Como demonstrado pela Figura 19, os efeitos da temperatura e da concentração de biomassa expressa um caráter positivo no rendimento de Fukugetina. À vista disso, quanto maior os valores destes fatores, maior a concentração do biocomposto. Situação oposta ocorre com o fator fração de água no solvente e sua interação com a temperatura. A presença destas variáveis do lado negativo do gráfico mostra que a adição de maior volume de água influencia na redução do rendimento da extração.

Outro recurso gráfico para avaliar o ajuste dos dados é o gráfico de probabilidade normal dos resíduos, que consegue identificar desvios substanciais da normalidade. A Figura 20 mostra este gráfico construído pelo modelo.

Figura 20 - Gráfico de probabilidade normal dos resíduos brutos para o planejamento CCRD



O gráfico da Figura 20 mostrou uma distribuição de resíduos uniforme, com poucos pontos distantes dos valores normais esperados, não se distanciando muito da reta identidade.

Outra forma de analisar os parâmetros significativos é a partir da análise de variância (ANOVA). A Tabela 14 contém os dados obtidos para a ANOVA deste planejamento. Cujos testes são estatísticas F e auxiliam a avaliar numericamente o ajuste do modelo. Em negrito estão os coeficientes considerados significativos para o teste segundo o modelo CCRD.

Tabela 14 - ANOVA para o CCRD 2^3 para extração de Fukugetina

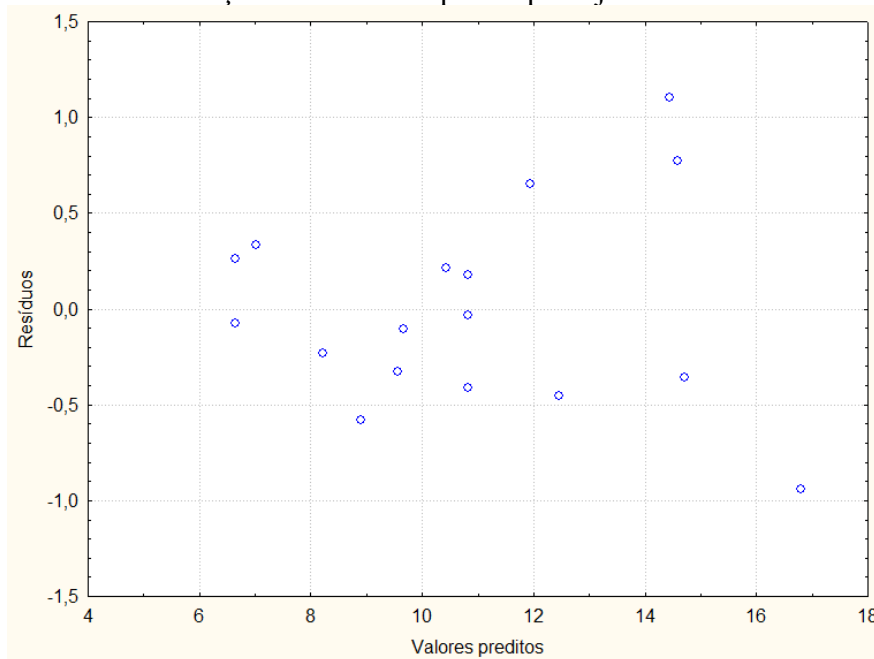
Fator	SS	D_f	MS	F	p
	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática		
(1)Var1 (L)	29,656	1	29,656	331,598	0,003002
Var1 (Q)	2,562	1	2,562	28,642	0,033185
(2)Var2 (L)	21,136	1	21,136	236,334	0,004205
Var2 (Q)	4,066	1	4,066	45,464	0,021295
(3)Var3 (L)	74,378	1	74,378	831,662	0,001200
Var3 (Q)	0,067	1	0,067	0,746	0,478863

1L by 2L	1,081	1	1,081	12,081	0,073736
1L by 3L	8,947	1	8,947	100,035	0,009849
2L by 3L	0,199	1	0,199	2,219	0,274775
Falta de ajuste	4,215	5	0,8431	9,427	0,098676
Erro	0,179	2	0,0894		
Total da soma quadrática	149,388	16			

O coeficiente de regressão encontrado para este delineamento foi de R^2 igual a 0,97058, respaldando a adequação ao modelo. Representa um bom valor de ajuste já que o estudo trabalhou com matéria prima biológica, sujeita a maior variabilidade da amostra. Os dados presentes na Tabela ANOVA (Tabela 14) corroboram os dados presentes na Tabela 13 e mostram que a falta de ajuste foi não significativa ($p < 0,05$).

A Figura 21 contém a distribuição dos resíduos deste ajuste. O gráfico mostra uma dispersão aleatória, e com variância praticamente constante, resíduos dispersos em torno de zero, concentrados majoritariamente entre -1 e 1, estando entre 5 e 10% do valor predito. Como não há um padrão aparentemente detectável no gráfico da Figura 21, supõe-se que variância constante (homocedasticidade) dos resíduos é válida para o modelo ajustado.

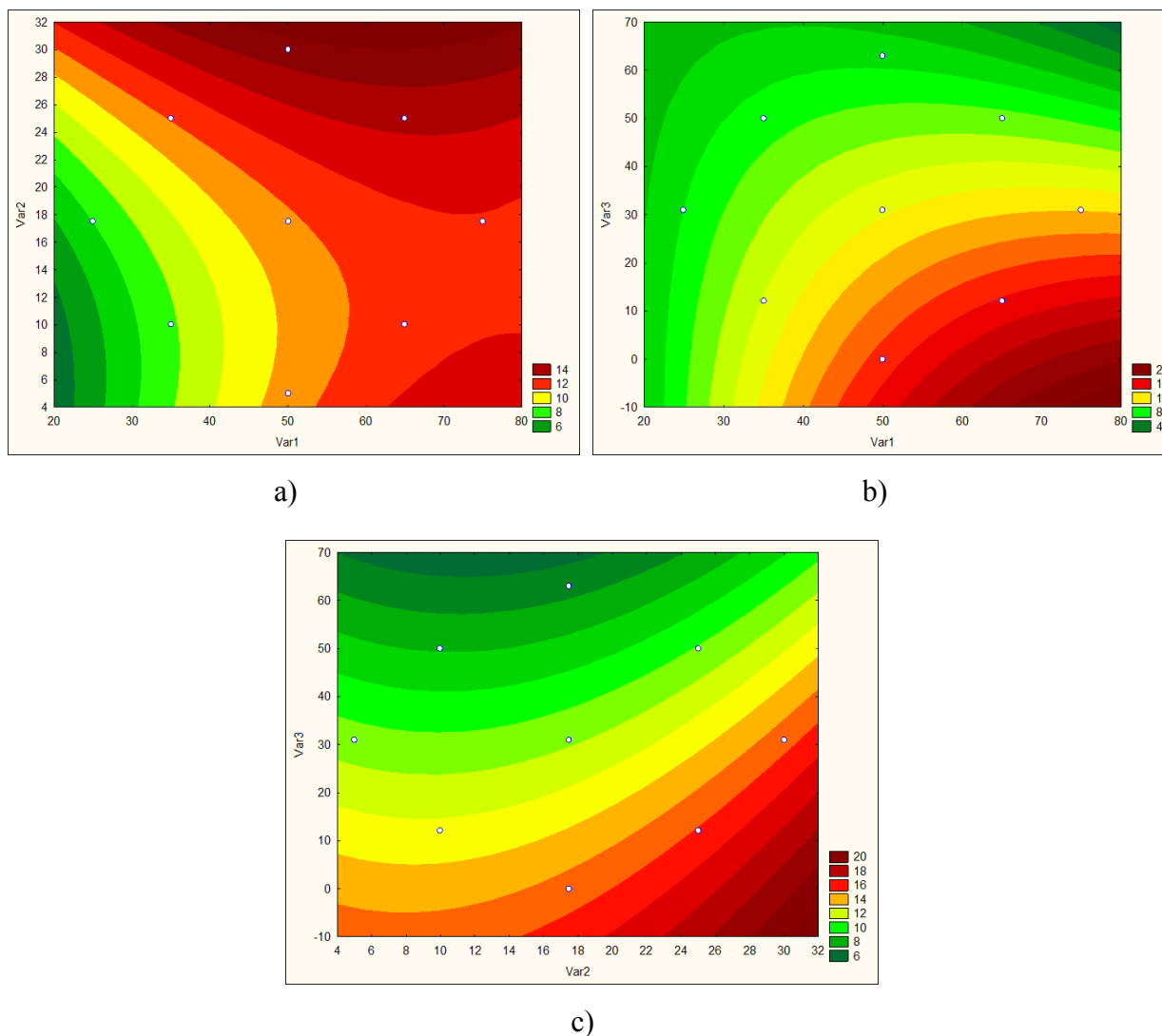
Figura 21 - Distribuição dos resíduos para o planejamento CCRD 2³



Assim, com a ANOVA significativa, a falta de ajuste não significativa e a distribuição dos resíduos aleatória, o modelo pode ser considerado consistente para avaliar a relação entre o rendimento de extração de Fukugetina e as variáveis independentes testadas.

A Figura 22 a seguir apresenta os gráficos de contorno construídos pelo modelo, que auxiliam na visualização da região ótima do sistema para maximização da resposta.

Figura 22 – Gráficos de contorno 2D ajustadas ao planejamento CCRD 2^3 para extração de Fukugetina²

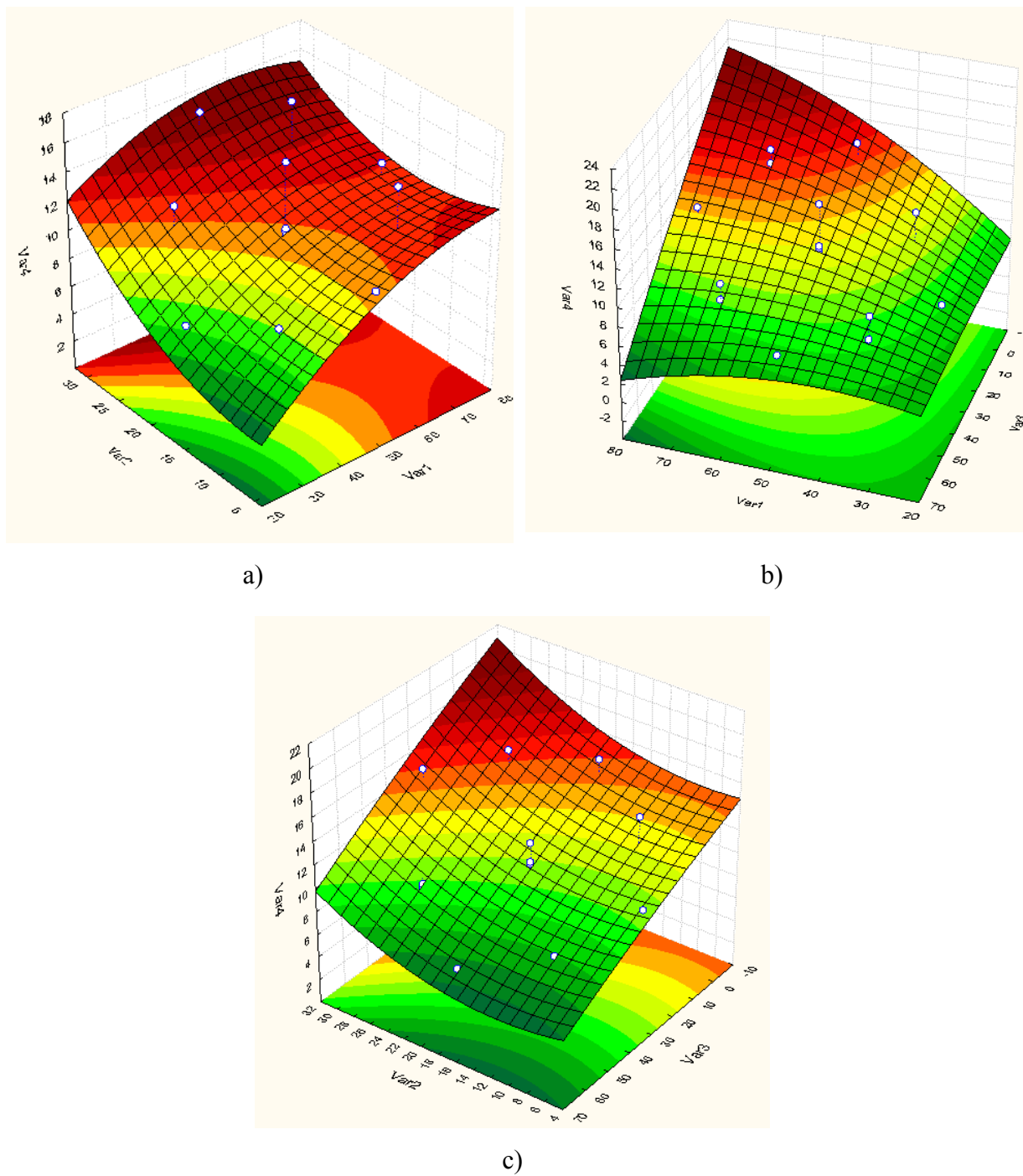


Para a construção dos gráficos de contorno (Figura 22) e das superfícies de resposta (Figura 23), um fator foi mantido constante enquanto os outros dois sofreram variação a fim de prever a região ótima de melhor rendimento de Fukugetina. O primeiro gráfico de contorno da Figura 22 possui como eixos: temperatura (Var1) e concentração de biomassa (Var2), o segundo gráfico relaciona as variáveis: temperatura e fração de água (Var3) e a última representa a superfície de formada pela concentração de biomassa (Var2) e fração de água (Var3), como pode ser verificado nos eixos dos gráficos. A Figura 23 ilustra as superfícies de resposta do planejamento, que representam a relação entre a resposta e pares de

² a) Gráfico de contorno Var1 x Var2; b) Gráfico de contorno Var1 x Var3; c) Gráfico de contorno Var2 x Var3.

variáveis de forma tridimensional. As superfícies foram construídas de maneira similar aos gráficos de contorno, com os mesmos eixos especificados na Figura 22.

Figura 23 - Superfície de resposta do planejamento CCRD 2^3 para o composto Fukugetina³



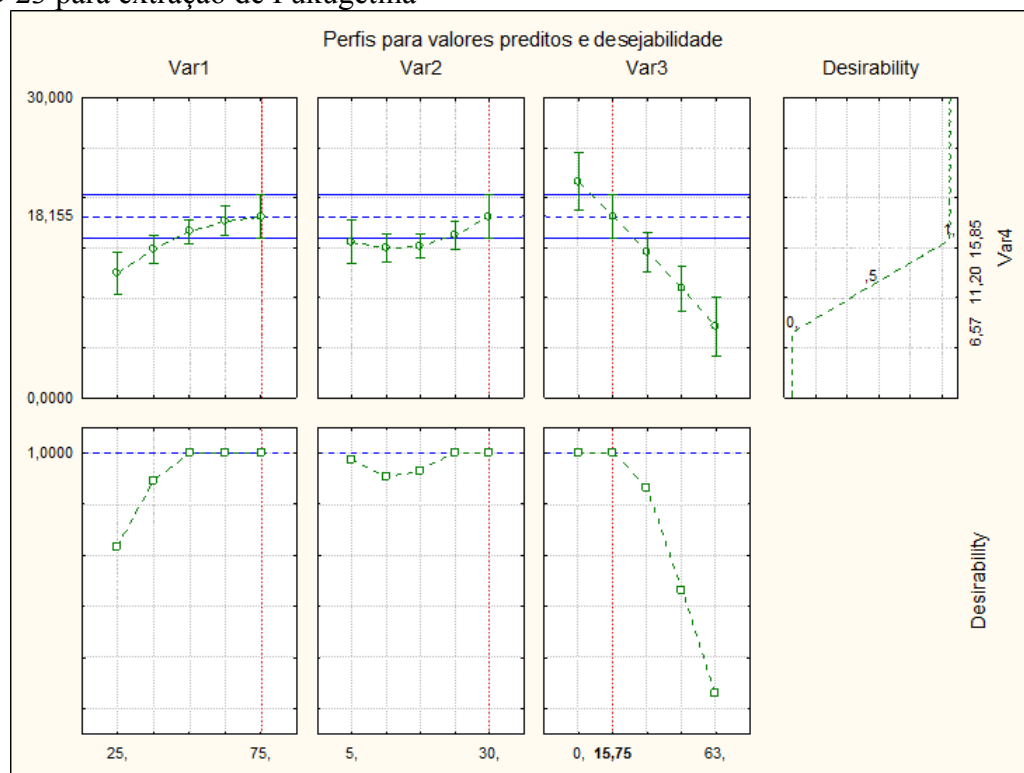
³ Superfície de Resposta Var1 x Var2; b) Superfície de Resposta Var1 x Var3; c) Superfície de Resposta Var2 x Var3.

Analizando os gráficos de contorno (Figura 22) e de superfície de resposta (Figura 23), nota-se que maiores concentrações de biomassa, bem como o aumento da temperatura poderiam resultar em maior rendimento, evidenciando uma necessidade de elevar os níveis dessas variáveis, já que apenas parte da superfície de resposta está dentro da região ótima (região de cores mais quentes). No entanto o aumento da proporção entre semente e solvente não era viável do ponto de vista experimental. Isso foi observado em testes preliminares realizados antes do planejamento experimental. Nesta etapa pregressa, foram realizadas extrações com variadas proporções de biomassa-solvente, até chegar a uma proporção na qual fosse inviável a extração. Esse fato foi percebido quando não foi possível separar a semente do extrato após o processo de MAE, pois a semente reteve todo o solvente. No caso da temperatura, estudos apontam que o aquecimento em altas temperaturas pode resultar em degradação de compostos fenólicos (BENER *et al.*, 2016, DOLDLOVA *et al.*, 2021). Além disso, do ponto de vista da química verde, não seria ideal alcançar esses valores tendo em vista que o planejamento visou a englobar a realidade da extração e evitar gastos de solventes e análises excessivas além de idealizar condições que favoreçam o novo solvente como uma alternativa viável aos solventes orgânicos.

Uma metodologia que pode ser utilizada para otimizar uma ou mais respostas de um modelo (maximizando a razão sinal/ruído) é a aplicação da função de desejabilidade proposta por Derringer e Suich (1980), função esta que se baseia na transformação de cada resposta individual em uma escala adimensional de desejabilidades individuais (d_i). A partir da média geométrica das desejabilidades individuais tem-se a desejabilidade global (D) e o intuito é maximizar D. A escala de desejabilidade varia de 0 a 1, em que o valor mínimo (0) é considerado uma resposta não aceitável e 1 a resposta desejada. Esta função pode ser utilizada quando se busca valores alvos (sejam eles de maximização ou minimização da resposta) ou ao menos mantê-los em faixas desejáveis. Tem como objetivo principal encontrar condições de operação que estejam consonantes com os critérios de todas as respostas obtidas e forneçam os valores de resposta mais desejável (BARROS NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2001).

A Figura 24 exibe o gráfico dos perfis dos valores otimizados, a função de desejabilidade e os valores otimizados dos três fatores avaliados no delineamento obtidos computacionalmente pelo software Statistica 7.0.

Figura 24 - Perfil sinal/ruído (previstos/otimizados) e perfil de desejabilidade para o CCRD 23 para extração de Fukugetina



Os três primeiros perfis da Figura 24 representam a razão entre os valores previstos e otimizados, mais conhecidos nessa função como sinal/ruído. O quarto perfil mostra a desejabilidade (D) desta razão, variando de 0 a 1. Verifica-se que quanto maior o valor de D mais conveniente é a resposta do sistema. Já os três perfis da parte inferior mostram a desejabilidade de cada variável individualmente. Os valores ótimos correspondem ao valor que toca a linha vertical em vermelho e foram descritos na Tabela 15.

Tabela 15: Valores ótimos para a extração de Fukugetina com NADES segundo o perfil de desejabilidade (Statistica 7.0)

Variável independente	Valor ótimo
Temperatura	75 °C
Concentração de biomassa	30% m/v
Fração de água no solvente	15,75% v/v

Avaliando cada perfil de desejabilidade dos fatores separadamente, observa-se que o fator temperatura (Var1) demonstrou um aumento acentuado na resposta em função do aquecimento da amostra, estabilizando a partir de 50 °C. Ademais, na faixa de temperatura estudada não foi percebida nenhuma degradação térmica (tendo em vista que não houve

queda de rendimento nas temperaturas superiores). Esperava-se essa relação direta entre aumento de temperatura e maior recuperação do composto, em razão do aumento da energia cinética das moléculas e consequente redução da viscosidade do solvente, que auxilia no processo de transferência de massa (CHEMAT *et al.*, 2016).

Concentrando-se no segundo perfil, nota-se que o comportamento do fator concentração de biomassa (Var2) sofreu uma leve oscilação, apontando para uma pequena queda de rendimento de FUK nos valores intermediários entre 5 e 25% m/v de semente no solvente e posterior aumento após este valor. Os dados sugerem que a transferência de massa entre sólido e solvente não ocorrem de maneira tão trivial, sendo altamente afetadas pelas demais variáveis do processo, no qual vários equilíbrios podem ocorrer, resultando em uma resistência à transferência de massa.

No terceiro perfil, avalia-se que a adição de água realmente favoreceu a extração até certo ponto. Após o valor limite de 15,75% v/v, a queda no rendimento foi abrupta. Conjectura-se que o aumento no rendimento tenha ocorrido devido à redução da viscosidade, facilitando a transferência de massa, tendo em vista que a alta viscosidade torna mais difícil para o solvente infiltrar na matriz vegetal (MULIA; FAUZIA; KRISANTI, 2019). A presença de água é capaz de reduzir a viscosidade e provocar um aumento da polaridade em NADES. Entretanto estudos apontam que adições excessivas de água podem enfraquecer as ligações de hidrogênio entre HBA e HBD (SAVI, 2019), por isso percebe-se o decaimento da concentração do composto. Ademais, outro ponto chave a ser observado, é a baixa solubilidade da molécula em água, prevê-se uma solubilidade abaixo de 0,01g.L⁻¹ para este biflavonoide (FOODB, 2019).

5.1.2. Otimização da extração de Guttiferona e 7-Epiclusianona

Para o sistema testado, nos níveis e fatores escolhidos, o NADES ChCl:AO não apresentou afinidade suficiente para extrair quantidades consideráveis destes compostos. O fator afinidade de um solvente pelo analito, no caso de solventes como os NADES, que são resultantes de misturas e cujas composições podem ser variáveis, pode ser um fator difícil de prever teoricamente. Em razão disso, a maior parte dos estudos tenta sanar essa problemática utilizando método de tentativa e erro para determinar os solventes mais estáveis e eficientes. Atualmente há um crescimento de pesquisas que exploram também a previsão de comportamento destes solventes via modelagem computacional, como a ferramenta para prever as interações (CUI *et al.*, 2021, ZUROB *et al.*, 2020).

Algumas adaptações no preparo da amostra para análise cromatográfica foram realizadas como redução da diluição do extrato. Ainda assim não foi possível quantificar o composto bioativo 7-Epiclusianona na faixa de estudo proposta, via análise cromatográfica, tendo em vista que a maioria dos cromatogramas não apresentaram pico no tempo de retenção especificado para este composto. No caso da Guttiferona-A, ainda foi possível observar a presença deste composto em alguns dos extratos, mas de forma bastante difusa, não sendo possível ajustar um modelo de superfície de resposta aos dados. A única inferência possível, de posse dos dados da Tabela 12, foi que a temperatura é um fator que auxilia na extração deste composto.

Esse comportamento de baixa extração pode ser atribuído ao perfil menos polar destas moléculas, se comparadas à Fukugetina. Em contrapartida, os NADES ácidos, como o [Ch]Cl:AO utilizado neste trabalho, tendem a ser solventes mais polares que aqueles constituídos à base de açúcares ou álcoois (ZUROB *et al.*, 2020; DAI *et al.*, 2013). Os NADES têm sido considerados solventes adequados para extração de compostos naturais devido à ampla faixa de polaridade e solubilidade (SAVI, 2019; DAI *et al.*, 2013). Entretanto, apesar da biocompatibilidade destes solventes com compostos polares e apolares, avalia-se que o NADES testado apresentou maior tendência a extrair compostos mais polares. Dessa forma, como os NADES são solventes desenháveis (ZUROB *et al.*, 2020, SAVI, 2019; CUNHA; FERNANDES, 2018), uma alternativa seria testar outras misturas eutéticas e/ou razões molares mais adequadas para extração destes compostos de interesse.

Os DES são solventes comumente mais hidrofílicos, consequência das ligações de hidrogênio presentes em sua composição (VAN OSCH *et al.*, 2015). Dessa maneira, podem ser mais eficazes para extrair moléculas com essa mesma facilidade de se dissolverem em meios aquosos. Estudos recentes apresentam uma nova classe de DES com caráter hidrofóbico, advindos de combinações de ácido decanoico com sais de amônio quaternário (VAN OSCH *et al.*, 2015) ou de misturas baseadas em DL-mentol com ácidos naturais (RIBEIRO *et al.*, 2015). Estes solventes podem tornar mais eficazes a extração de analitos com porções majoritariamente apolares (VAN OSCH *et al.*, 2015). Entretanto, ainda há poucos estudos envolvendo extração de compostos bioativos de plantas com DES hidrofóbicos (CAO *et al.*, 2017), sendo fonte para possíveis pesquisas futuras.

5.2. Perfis comparativos: NADES x solventes convencionais para extração das biomoléculas

Ao analisar a capacidade extratora de um novo solvente em uma matriz vegetal, é importante ser possível comparar os dados obtidos com extratos obtidos com solventes convencionais disponíveis para o processo. Por isso, para efeitos comparativos entre os extratos de NADES e os extratos de solventes convencionais, considerou-se a realização de testes de conteúdo fenólico, flavonoides, capacidade antioxidante e quantificação cromatográfica. Os extratos utilizados estão especificados na Tabela 16.

Tabela 16 - Extratos avaliados na determinação de fenólicos, flavonoides e capacidade antioxidante

Extrato	Solvente	Temperatura °C	[biomassa] (%m/v)	Fração de água (%v/v)
E1	Água	30	30	-
E2	Etanol	30	30	0
E3	Acetato de etila	30	30	0
E4	NADES [Ch]Cl:AO	30	30	0
E5	NADES [Ch]Cl:AO	65	30	12
E6	NADES [Ch]Cl:AO	75	30	15,75

Conforme mencionado na metodologia deste estudo (item 4.4), as extrações com os solventes convencionais (água, etanol e acetato de etila) ocorreram à temperatura ambiente (~30 °C), com 25% de biomassa e com os solventes puros. Observa-se que o extrato E4 representa uma extração com o DES nas mesmas condições aplicadas aos solventes convencionais, o extrato E5 corresponde ao extrato que obteve o maior rendimento de fukugetina apresentado pelo planejamento experimental, (Ensaio 4 da Tabela 12- 65 ° C, com 25% de biomassa e 12% de água adicionada ao solvente) e o extrato E6 foi obtido nas condições consideradas ótimas pelo modelo CCRD. É sabido que extrações de compostos fenólicos com água resultam em baixos rendimentos, mas manteve-se este solvente para fins de controle.

5.2.1. Quantificação cromatográfica de extratos selecionados

A quantificação cromatográfica dos extratos determinou alguns dos compostos já isolados nesta espécie, e que foram majoritários em estudos pregressos de extração da semente com solventes orgânicos (RODRIGUES, 2019). Deste modo, quantificou-se

Guttiferona-A, Fukugetina e 7-Epiclusianona nos extratos selecionados e descritos na Tabela 16. Essa quantificação foi realizada da mesma maneira que nas análises já apresentadas referentes aos ensaios do planejamento experimental do presente estudo, ou seja, considerando os tempos de retenção apresentados nos cromatogramas dos padrões isolados (Figura 17) e a partir das curvas analíticas dos compostos.

As Figuras 25, 26, 27, 28, 29 e 30 a seguir apresentam os cromatogramas dos extratos E1, E2, E3, E4, E5 e E6, respectivamente, obtidos nas condições de análise descritas em metodologia (Tópico 4.5.4 do presente trabalho).

Figura 25 - Cromatograma obtido por HPLC-UV ($\lambda=254\text{nm}$) do extrato da biomassa de semente de bacupari utilizando água como solvente (Extrato E1)

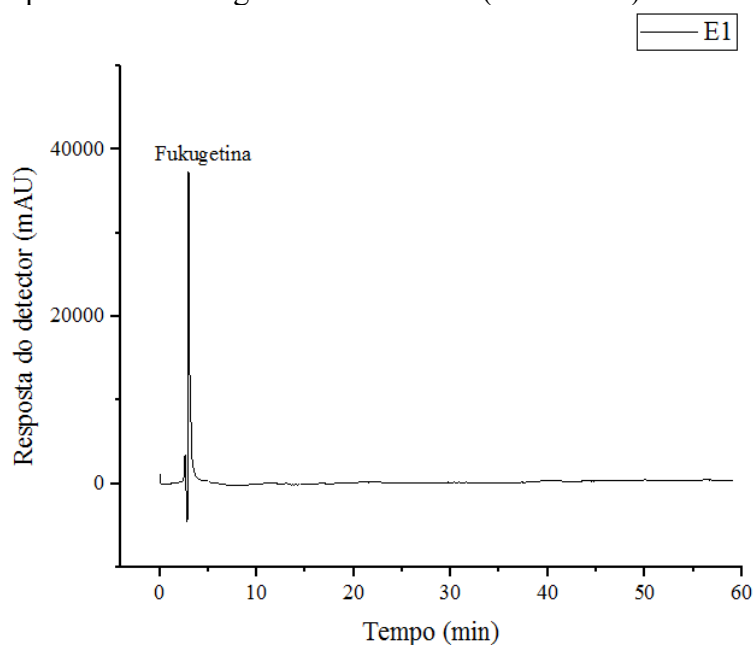


Figura 26 - Cromatograma obtido por HPLC-UV ($\lambda=254\text{nm}$) do extrato da biomassa de semente de bacupari utilizando etanol como solvente (Extrato E2)

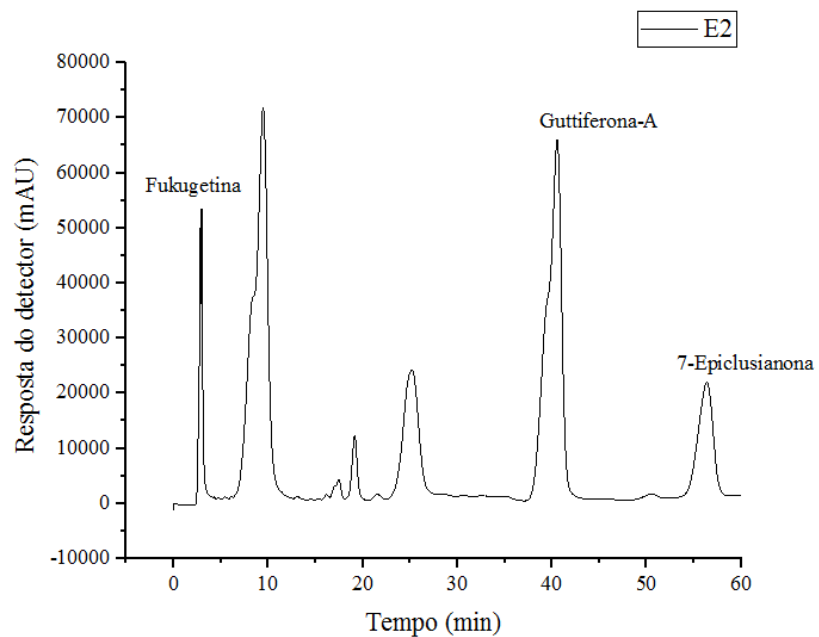


Figura 27 - Cromatograma obtido por HPLC-UV ($\lambda=254\text{nm}$) do extrato da biomassa de semente de bacupari utilizando acetato de etila como solvente (Extrato E3)

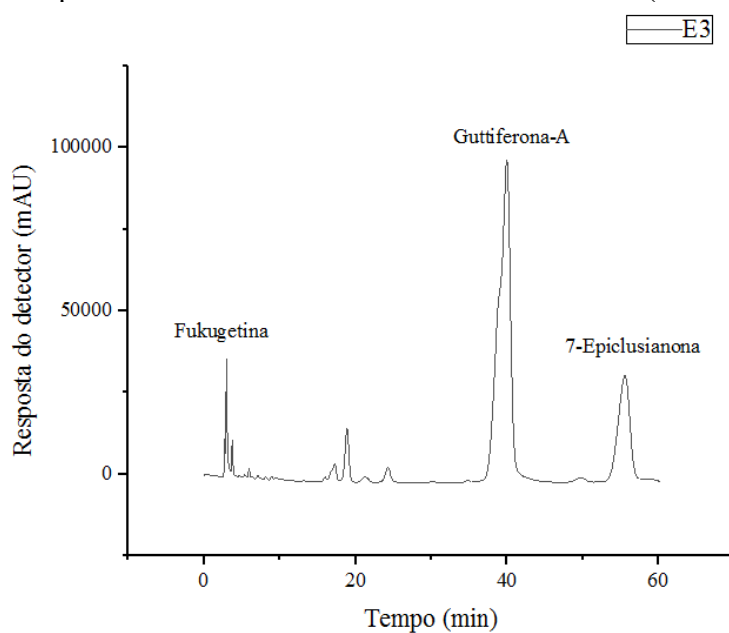


Figura 28 - Cromatograma obtido por HPLC-UV ($\lambda=254\text{nm}$) do extrato da biomassa de semente de bacupari utilizando NADES [Ch]Cl: AO como solvente (Extrato E4)

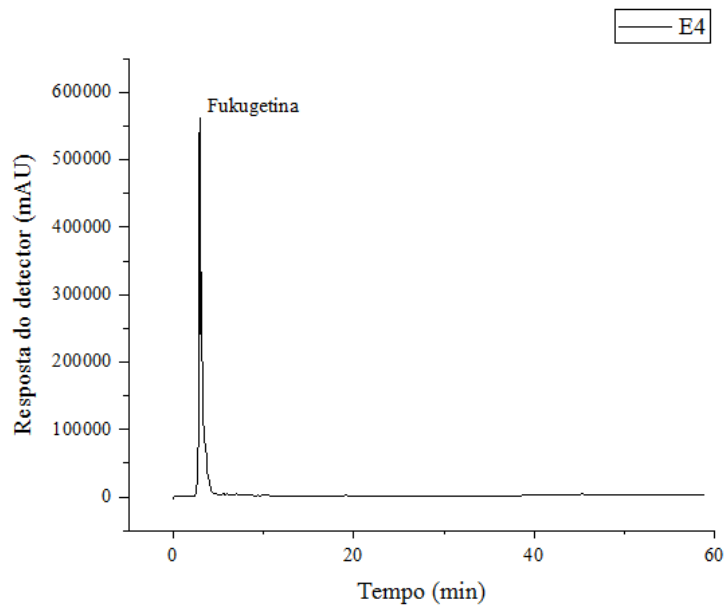


Figura 29 - Cromatograma obtido por HPLC-UV ($\lambda=254\text{nm}$) do extrato da biomassa de semente de bacupari utilizando NADES [Ch]Cl: AO como solvente (Extrato E5)

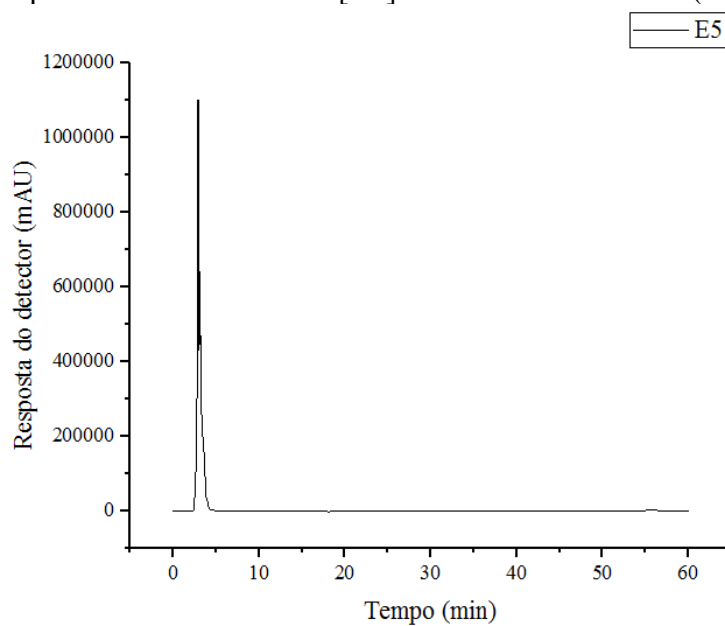
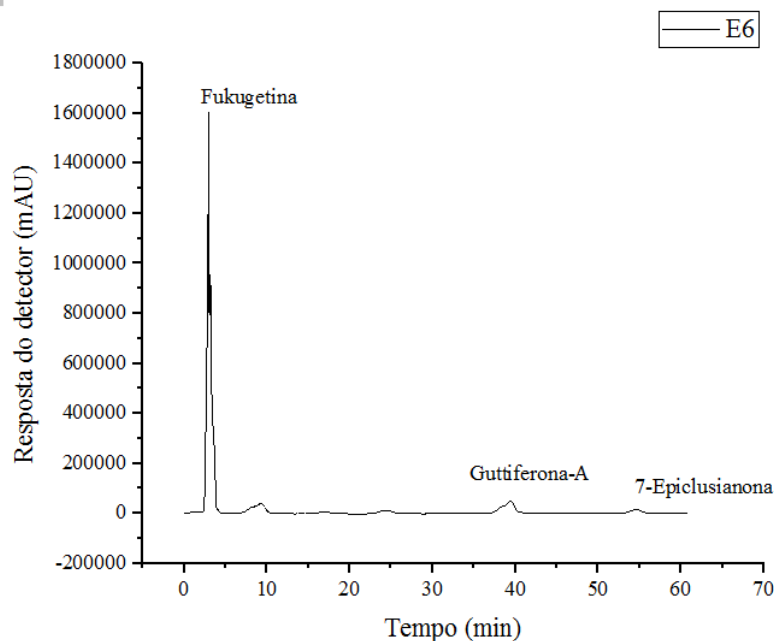


Figura 30 - Cromatograma obtido por HPLC-UV ($\lambda=254\text{nm}$) do extrato da biomassa de semente de bacupari utilizando NADES [Ch]Cl: AO como solvente (Extrato E6)



Todos os extratos testados apresentaram picos do composto Fukugetina conforme pode ser visualizado nos cromatogramas (Figuras 25-30), inclusive o extrato E1, que apesar da baixa concentração foi possível quantificar este composto. Fato explicado pelo perfil hidrofílico demonstrado por esta molécula. Já as benzofenonas Guttiferona-A e 7-Epiclusianona não apresentaram a mesma constância.

Observa-se nos cromatogramas dos extratos E2 e E3, de etanol e acetato de etila (Figuras 26 e 27), a presença dos 3 compostos investigados e de vários outros não identificados. Os extratos E1, E4 e E5 foram seletivos para o biflavonoide Fukugetina, com maior rendimento para o extrato E5. Já o extrato E6, correspondente ao ponto ótimo indicado pelo planejamento estatístico resultou em um rendimento superior de Fukugetina, e foi capaz de extrair Guttiferona-A e 7-Epiclusianona. Entretanto, nem todas as repetições deste extrato apresentaram os três compostos, como mostram os cromatogramas contidos no Anexo A. Dessa forma o rendimento de extração foi considerando reprodutível somente para a Fukugetina neste sistema, mas este resultado demonstra que o NADES testado também apresenta capacidade de extrair estes compostos se submetidos a maiores temperaturas.

A Tabela 17 a seguir apresenta as concentrações obtidas para as moléculas estudadas, por meio da quantificação cromatográfica. Os dados apresentam o valor médio de concentração e seu respectivo desvio padrão, tendo em vista que advém de repetições

realizadas no tempo para cada extrato a fim de apontar a confiabilidade e reprodutibilidade dos dados.

Tabela 17 - Concentração média dos biocompostos Fukugetina, Guttiferona-A e 7-Epiclusianona, nos extratos selecionados de NADES, etanol, acetato de etila e água

Extrato	Solvente	[FUK] g.L ⁻¹	[GUT] g.L ⁻¹	[EPI] g.L ⁻¹
E1	Água	0,16±0,155	0	0
E2	Etanol	0,66±0,025	11,25±0,125	11,25±0,125
E3	Acetato de etila	0,195±0,005	17,38±0,115	17,38±0,115
E4	NADES [Ch]Cl:AO	11,34±0,580	0	0
E5	NADES [Ch]Cl:AO	15,45±0,395	0	0
E6	NADES [Ch]Cl:AO	28,18±4,2042	2,81±3,739	1,53±1,839

Algumas características inerentes aos solventes são capazes de influenciar o processo de extração. A viscosidade de um fluido, por exemplo, é capaz de influenciar diretamente na transferência de massa entre solvente e soluto. Fluidos menos viscosos são mais desejáveis para aplicação como solventes. Em geral, DES e NADES são solventes que apresentam alta viscosidade em razão das fortes interações de hidrogênio (ZHANG *et al.*, 2012; QIN *et al.*, 2020) o que resulta em menor mobilidade das moléculas. Consequentemente, nota-se que o extrato de menor rendimento, excluindo E1, foi exatamente o extrato E4 em que o solvente verde foi utilizado puro e à temperatura ambiente. Desse modo, nota-se a influência da temperatura e da adição de água ao solvente na redução da viscosidade e o aumento da taxa de transferência de massa, conforme reportado em estudos pregressos (SAVI, 2019; MULIA; FAUZIA; KRISANTI, 2019).

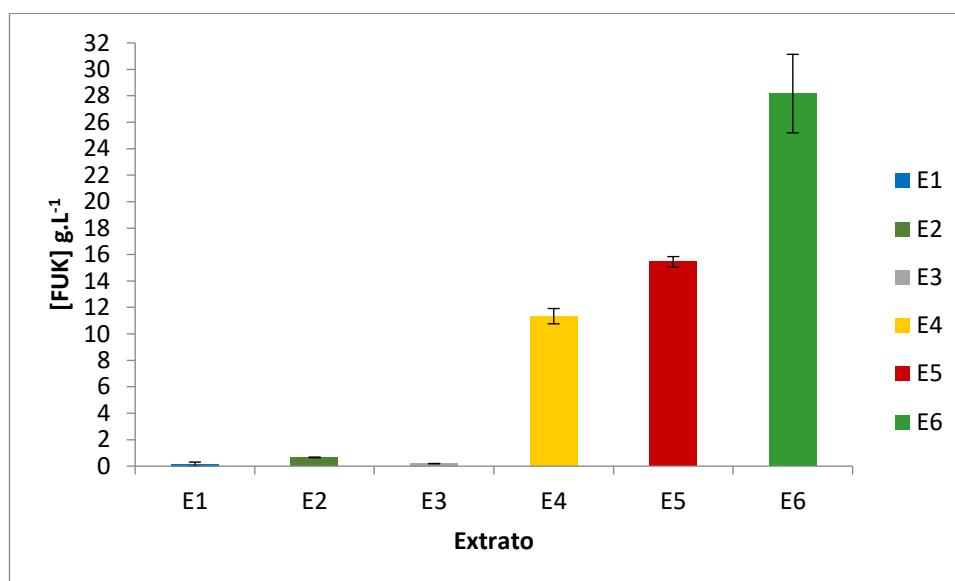
Outro fator importante é a polaridade das substâncias, visto que o caráter polar ou apolar de um solvente influencia diretamente na solubilidade dos compostos (MARTINS, LOPES, ANDRADE, 2013). Uma maneira de mensurar a polaridade de um solvente é a partir do valor de sua constante dielétrica ou permissividade relativa (ϵ_r) (CHEMAT *et al.*, 2019). Consideram-se solventes com valor de permissividade relativa (constante dielétrica) inferior a 15 como apolares. Comparando os solventes convencionais testados, temos um valor de permissividade de 80,1 para a água, de 25,3 para o etanol e de 6,08 para o acetato de etila (HAYNES, 2014). Nota-se a forte polaridade da água e, consequentemente, este é um solvente inapropriado para substâncias apolares ou semipolares (CHEMAT *et al.*, 2019).

enquanto o etanol é um solvente de características intermediárias, o que facilitou a extração de compostos tanto polares quanto apolares. Dos três solventes convencionais avaliados, o acetato de etila é o que possui a menor polaridade, possibilitando um maior rendimento para extração de GUT e EPI. Ademais, o acetato de etila trata-se de um solvente aprótico, enquanto etanol e água são próticos. No caso do NADES, essa relação é mais complexa, tendo em vista que essa medida não leva em conta as interações a nível molecular entre soluto e solvente, possível formação de ligações de hidrogênio e fatores sinérgicos que podem ocorrer devido ao solvente ser resultante de uma mistura.

Analisando a estrutura molecular dos biocompostos (Figuras 4, 5 e 6), é ainda mais nítida a tendência polar da Fukugetina (Figura 6), tendo em vista a presença de um maior número de grupamentos polares, principalmente grupos hidroxila. A presença de tais grupos aumenta a possibilidade de ocorrência de ligações de hidrogênio entre soluto e solvente em solventes que fazem este tipo de interação (como o NADES), o que leva a um aumento da solubilidade (MARTINS, LOPES, ANDRADE, 2013). Guttiferona-A (Figura 4) e 7-Epiclusianona (Figura 5) são moléculas relativamente grandes e que apresentam poucos grupos –OH em sua estrutura, principalmente o segundo composto.

O etanol pode ser considerado um ótimo solvente para extrair compostos fenólicos, tendo em vista sua facilidade de extrair diversas substâncias pela presença de uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica. Entretanto esta característica pode não ser benéfica em algumas extrações, uma vez que resulta em extratos com presença de diversos compostos indesejados e, conseqüente, necessidade de etapas posteriores de separação e purificação dos compostos. Situação distinta foi apresentada pelo solvente verde estudado, uma vez que o NADES [Ch]Cl:AO, nas condições estabelecidas, além de apresentar um potencial extrator significativamente superior quando comparado aos solventes convencionais testados, como pode ser melhor visualizado na Figura 31 a seguir, revelou-se também como um potencial solvente seletivo para Fukugetina e possivelmente para compostos estruturalmente semelhantes. Tal fato poderia auxiliar na redução de etapas de separação e purificação, uma vez que são fases ainda complexas e caras (ZUROB *et al.*, 2020). Dessa forma, manter o solvente é uma solução para reduzir custos do processo. Além disso, estudos apontam que o NADES pode auxiliar na estabilidade dos biocompostos pós-extração (DAI *et al.*, 2015), sem afetar a qualidade e segurança dos produtos (ZUROB *et al.*, 2020). Ainda assim, estudos nesta área devem ser intensificados para avaliar a real biocompatibilidade destes solventes com o organismo.

Figura 31 - Comparativo entre a capacidade de extração dos solventes convencionais e do NADES para o biocomposto Fukugetina



O NADES obteve rendimento de Fukugetina superior aos solventes convencionais, independente da temperatura e fração de água. Dentre os extratos deste solvente, os maiores rendimentos foram do ponto ótimo (E6), seguido do ponto com maior rendimento do planejamento (E5) e do extrato que utilizou DES puro a temperatura ambiente (E4).

Os solventes apresentaram perfis de extração parecidos para os compostos Guttiferona e 7-Epiclusianona. O estudo mostrou que os solventes orgânicos foram capazes de extrair mais facilmente estas biomoléculas, principalmente o acetato de etila, seguido do etanol. O solvente verde testado nesta pesquisa não apresentou bons resultados para estes compostos, mesmo no ponto ótimo proposto pelo modelo. Entretanto, o emprego destes solventes na extração de biocompostos, mais especificamente de benzofenonas, deve ser revisto, a fim de modelar o solvente alterando seus constituintes para atribuir características que facilitem a extração de moléculas mais apolares. Nota-se que os valores observados para o extrato E6, sofreram maiores variações, resultando em medidas com maiores desvios. Além das instabilidades já previstas neste sistema como uso de matéria prima biológica, e pequenas variações não controláveis do sistema, avalia-se que a principal causa para este acontecimento seja uma possível decomposição estrutural destes compostos na presença de temperaturas mais altas, tendo em vista que compostos fenólicos podem sofrer degradação nestas condições (BENER *et al.*, 2016). Além disso, o efeito potencializador atribuído ao uso de micro-ondas também deve ser considerado, uma vez que o equipamento oferece um ambiente extremo de extração, capaz de elevar a temperatura do extrato de forma muito mais uniforme

e eficiente (SROGI, 2006). Posto isto, propõe-se estudar temperaturas que não ultrapassem 75 °C.

5.2.2. Determinação de compostos fenólicos de extratos selecionados usando NADES e solventes convencionais

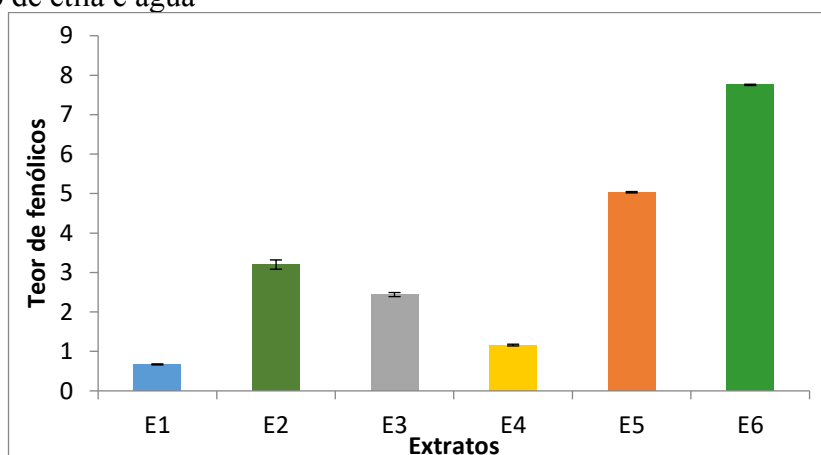
Para quantificar os compostos fenólicos presentes nos extratos mencionados na Tabela 16, primeiramente construiu-se uma curva padrão de ácido gálico considerando a relação linear entre a absorbância do composto e a concentração ($y = 0,0008x + 0,0006$), obtendo-se um coeficiente de determinação $R^2=0,9951$. A Tabela 18 mostra os rendimentos médios de compostos fenólicos para os extratos selecionados.

Tabela 18 - Conteúdo fenólico total médio dos extratos de semente de bacupari utilizando NADES, etanol, acetato de etila e água como solvente extrator

Extrato	Solvente	Conteúdo Fenólico (mgAG.mL ⁻¹ extrato)
E1	Água	0,670±0,0130
E2	Etanol	3,201±0,1117
E3	Acetato de etila	2,440±0,0519
E4	NADES [Ch]Cl:AO	1,161±0,0225
E5	NADES [Ch]Cl:AO	5,034±0,0059
E6	NADES [Ch]Cl:AO	7,755±0,0102

A Tabela 18 aponta que o maior resultado para compostos fenólicos foi obtido pelo extrato de NADES no ponto ótimo do sistema (E6), seguido do extrato E5 em que também foi utilizado o solvente verde. Logo em seguida, observaram-se maiores concentrações de polifenóis no extrato etanólico (E2), sucedido do extrato com o solvente acetato de etila (E3) e dos extratos E4 e E1, nesta ordem, como pode ser visualizado na Figura 32.

Figura 32 - Teor de polifenóis em extratos obtidos a partir dos solventes: NADES, etanol, acetato de etila e água



5.2.3. Determinação do teor de flavonoides totais em extratos selecionados usando NADES e solventes convencionais

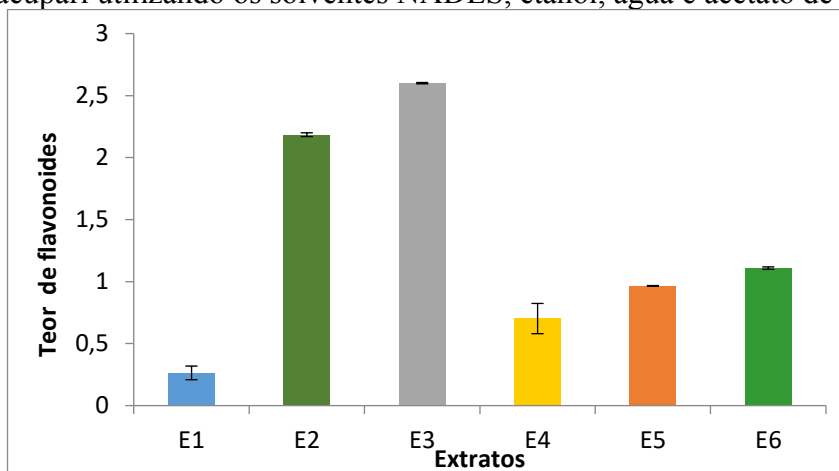
Os extratos especificados na Tabela 16 do Tópico 5.2 também foram caracterizados quanto ao teor de flavonoides totais. Os resultados foram descritos em mg de quercetina por mL de extrato bruto para todos os extratos e estão relacionados na Tabela 19 a seguir. As concentrações foram calculadas a partir da equação linear da curva padrão de quercetina ($y=0,0053x+0,0474$), cujo coeficiente de determinação R^2 foi de 0,9935.

Tabela 19 - Teor de flavonoides totais em extratos de semente de bacupari utilizando NADES, etanol, acetato de etila e água como solvente extrator

Extrato	Solvente	Flavonóides totais (mgAG.mL ⁻¹ extrato)
E1	Água	0,264±0,05516
E2	Etanol	2,184±0,0154
E3	Acetato de etila	2,600±0,0054
E4	NADES [Ch]Cl:AO	0,702±0,1220
E5	NADES [Ch]Cl:AO	0,965±0,0028
E6	NADES [Ch]Cl:AO	1,109±0,0098

O gráfico da Figura 33 retrata um comparativo entre a concentração de flavonoides obtida em cada extrato selecionado.

Figura 33 - Gráfico comparativo entre a capacidade de extração de flavonoides de semente de bacupari utilizando os solventes NADES, etanol, água e acetato de etila



Todos os extratos apresentaram respostas positivas para a análise de flavonoides totais, entretanto os solventes orgânicos testados (etanol e acetato de etila) apresentaram respostas superiores de concentração destes biocompostos. Observando a Figura 33 constata-se que para a extração de flavonoides totais, os solventes etanol e acetato de etila apresentaram desempenho levemente melhor que os extratos contendo NADES. Conforme foi visto nos cromatogramas destes solventes, houve extração de diversos outros compostos que podem ter influenciado nesta resposta. Além disso, nesta caracterização, os extratos de NADES apresentaram valores de extração próximos, embora os extratos tenham sido submetidos à diferentes temperaturas e razão de água adicionada ao solvente, mas ainda assim, o ponto ótimo apresentou melhor resposta conforme previsto pelo modelo estatístico, confirmando as quantificações feitas anteriormente.

5.2.4. Capacidade antioxidante

Para a análise da capacidade antioxidante dos extratos, prepararam-se soluções estoque de cada extrato em etanol 80%, nas diluições descritas na Tabela 20 a seguir, das quais foram retiradas as alíquotas a serem misturadas com a solução de DPPH em metanol conforme metodologia descrita no tópico 4.5.3.

Tabela 20 - Razão de extrato em solução de etanol 80% para teste de atividade antioxidante

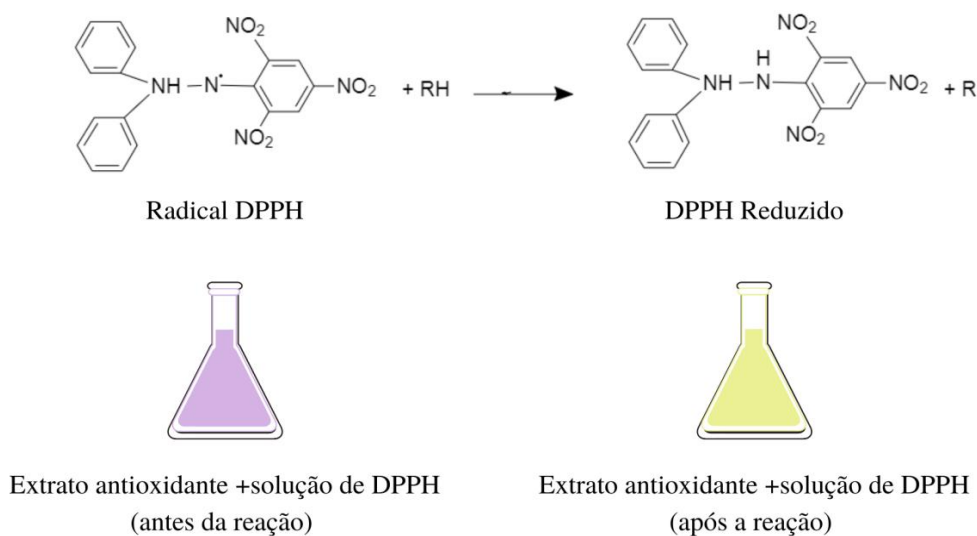
Extrato	Diluição
E1	1:1 v/v
E2	1:5 v/v

E3	1:5 v/v
E4	1:5 v/v
E5	1:5 v/v
E6	1:5 v/v

Considerando o tempo de estabilização das amostras, não foi possível testar maiores diluições, principalmente para o extrato que utilizou água como solvente extrator, pois na concentração original, a amostra estabilizou somente após muitas horas de análise. Consequentemente, para fins comparativos, optou-se por diluições iguais, exceto para a água, com o intuito de promover uma uniformidade dos dados apresentados sobre o decaimento da absorbância contidos na Figura 35 e para o cálculo do percentual de atividade antioxidante (Tabela 21).

Em paralelo, foram preparadas soluções controle de cada extrato, contendo apenas a solução de DPPH e a alíquota do solvente utilizado na extração, diluído nas mesmas proporções do extrato. Realizou-se a leitura das absorbâncias por certo período de tempo a fim de observar o decaimento da absorbância de DPPH de cada amostra até a estabilização. Ao fim das reações, foi possível perceber a mudança de coloração de uma solução arroxeada para uma solução levemente amarelada devido à redução do radical DPPH, como ilustra a Figura 34.

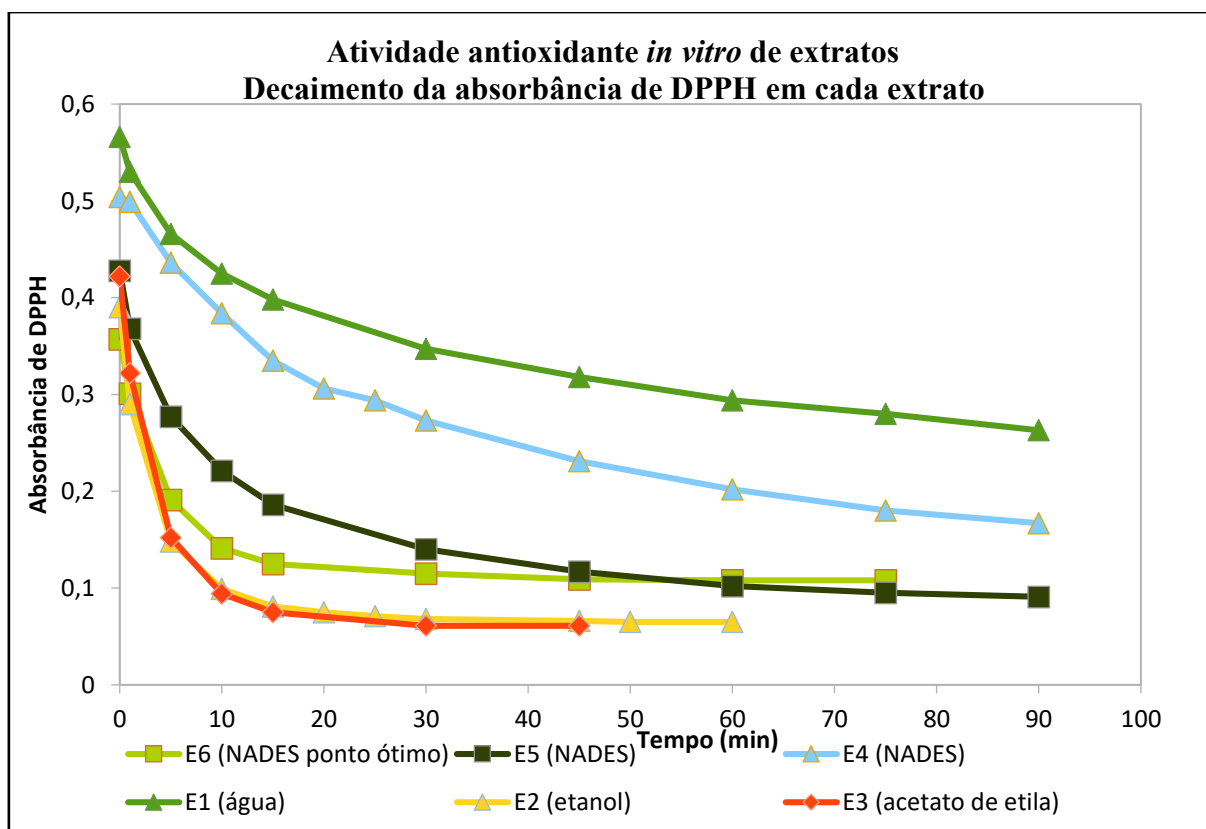
Figura 34 - Reação de estabilização do radical DPPH na presença de compostos antioxidantes (RH) presentes nos extratos de semente de bacupari



Fonte: Autoria própria.

A reação ilustrada na Figura 34 ocorreu para cada uma das amostras de extratos, em tempos distintos de estabilização da absorbância e, conseqüentemente, término da reação. O gráfico apresentado na Figura 35 apresenta um comparativo entre decaimento da absorbância das amostras de cada extrato em função do tempo.

Figura 35 - Decaimento da absorbância de DPPH nos extratos semente de bacupari E1, E2, E3, E4, E5 e E6



Observa-se no gráfico da Figura 35 que os extratos obtidos por solventes orgânicos (etanol e acetato de etila) se comportaram de maneira muito parecida, apresentando um perfil de decaimento da absorbância mais acentuado em comparação aos demais extratos. O extrato referente ao ponto ótimo modelado pelo planejamento resultou em um perfil próspero se comparado aos solventes convencionais e também frente aos outros dois extratos de DES (E4 e E5), o que demonstra que a otimização dos dados obteve resposta positiva para esta pesquisa. O extrato E1 apresentou decaimento lento e bastante aquém dos demais solventes.

A partir das leituras das absorbâncias dos extratos após 30 minutos de reação, determinou-se o percentual de atividade antioxidante (%AA), que corresponde à porcentagem de inibição/ sequestro do radical DPPH, os valores foram dispostos na Tabela 21 a seguir.

Tabela 21 - Avaliação quantitativa dos extratos selecionados quanto ao percentual de atividade antioxidante

	Extrato	%AA
E1	Água	38,80
E2	Etanol	87,72
E3	Ac. etila	88,52
E4	DES 100%	49,07
E5	DES 88%, 65 °C	74,41
E6	DES 88%, 75 °C	78,98

Quanto maior o consumo de DPPH pela amostra, maior o valor da atividade antioxidante. Assim, entende-se que acetato de etila e etanol obtiveram atividades antioxidantes de maior magnitude e valores bastante próximos, fato que pode ser comprovado pelo gráfico da Figura 35 que mostra a curva de decaimento da absorbância de DPPH destes solventes praticamente sobrepostas. Em relação ao DES, percebe-se que a atividade antioxidante do extrato E4, obtido a partir de uma extração sem adição de água e à temperatura ambiente não obteve resultado satisfatório, o que já era esperado tendo em vista os resultados encontrados pelo planejamento experimental. Entretanto, extratos de DES submetidos à temperatura e adição de água, como E5 e E6 apresentaram percentuais de sequestro do radical DPPH mais eficientes e próximos aos melhores solventes testados nesta biomassa, principalmente o extrato E6.

Nesta pesquisa o extrato com maior concentração de flavonoides (extrato E3), foi exatamente o extrato com maior atividade antioxidante total. Estes dados corroboram os resultados obtidos nos testes anteriores e traçam um paralelo com os valores obtidos para flavonoides, uma vez que corrobora com a tese de que flavonoides são um dos principais compostos fenólicos com capacidade antioxidante (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

6. CONCLUSÕES

A extração de biocompostos do bacupari utilizando MAE mostrou-se um processo bastante rápido e de alto rendimento. Verificou-se que o emprego de solventes eutéticos profundos é uma alternativa que merece maior foco, uma vez que demonstrou alta capacidade de extração de polifenóis. Além disso, a escolha do NADES [Ch]Cl:AO resultou em uma extração eficaz e seletiva para o biflavonoide Fukugetina. Fato que também expôs a biodisponibilidade de biflavonoides com rendimento considerável em partes da planta menos exploradas, como as sementes, tendo em vista que a maioria dos estudos pregressos avaliavam as folhas desta espécie, considerando que maior concentração destes compostos, estivessem presentes nessa região.

Outro ponto chave deste estudo compreende o emprego de metodologia de superfície de resposta a fim de avaliar melhor as condições do processo reduzindo custo e tempo de análise. O modelo CCRD 2³ aplicado, foi capaz de otimizar os dados obtidos para Fukugetina e encontrar rendimentos bastante superiores aos solventes convencionais testados. Embora o NADES testado não tenha sido efetivo para extrair Guttiferona-A e 7-Epiclusianona, não diminui a relevância do presente estudo e sim abre precedentes para pesquisas futuras que empreguem outros constituintes para o desenho de outros solventes verdes mais seletivos para moléculas menos polares como estas.

Enfatiza-se que, em se tratando de compostos naturais como a matéria prima utilizada neste trabalho, pode haver uma variação normal na concentração dos compostos encontrados em decorrência de mudanças sazonais, características do solo, tempo de coleta. Assim, os dados presentes neste estudo retratam uma condição específica. Entretanto, o estudo da otimização de dados avaliada pela metodologia de resposta, bem como os resultados advindos dos testes de quantificação são extremamente relevantes para confirmar que os DES são solventes promissores considerando toda a eficiência, baixo custo, ajustabilidade e seletividade a certos compostos.

7. PERSPECTIVAS

Espera-se que este estudo possa ampliar a aplicação dos solventes eutéticos profundos naturais como uma alternativa mais “verde”, sustentável e versátil ao uso de solventes orgânicos. A obtenção de compostos bioativos do bacupari (*Garcinia gardneriana*), com elevados potenciais terapêuticos como as moléculas Fukugetina, Guttiferona-A, e 7-Epiclusianona usando químicos renováveis permite gerar impactos positivos na área técnico-científica, pois possibilita a publicação de dados inéditos de extração de moléculas bioativas de bacupari por solvente eutéticos profundos naturais. Desta forma, além da contribuição com informações para a comunidade científica, há a possibilidade, futuramente, de ampliação do campo de aplicações dos NADES, principalmente no âmbito farmacêutico, com a criação de novos medicamentos fitoterápicos, de alimentos e cosméticos.

Além disso, esta pesquisa propõe agregar valor ao fruto e gerar espaços promissores para o desenvolvimento de uma nova rota econômica para o bacupari, utilizando partes não comestíveis desta planta nativa do Brasil e ainda tão pouco explorada. É notável que o desenvolvimento do setor de plantas medicinais e de medicamentos fitoterápicos pode configurar-se como uma importante estratégia para o enfrentamento das desigualdades regionais do país, ao gerar uma oportunidade de renda em áreas de menor dinamismo econômico.

Ademais, nota-se a necessidade de desenvolver novas rotas de extração envolvendo solventes eutéticos profundos e buscar aliar otimização estatística e molecular para ser possível prever a tendência de extração de várias moléculas a partir de distintas composições para os NADES.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, A. P. *et al.* Preparation of novel, moisture-stable, Lewis-acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains. **Chemical Communications**, [S.L.] n. 19, p. 2010-2011, 2001. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b106357j>.
- ABBOTT, A. P. *et al.* Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile alternatives to ionic liquids. **Journal of the American Chemical Society**, [S.L.], v. 126, n.29, p. 9142–9147, 2004. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja048266j>.
- AGRA, M. de F. e; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 472-508, set. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2008000300023>.
- ALANÓN, M. E. *et al.* A novel sustainable approach for the extraction of value-added compounds from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces by natural deep eutectic solvents. **Food Research International**, [S.L.], v. 137, p. 109646, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109646>.
- ALMEIDA, L. S. B. *et al.* Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine**, [S.L.], v. 15, n. 10, p. 886-891, out. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2007.12.003>.
- ALVES, T. M. de A. *et al.* Biological Activities of 7-Epiclusianone. **Journal of Natural Products**, [S.L.], v. 62, n. 2, p. 369-371, fev. 1999. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/np9803833>.
- ASSIS, D. M.; *et al.* Inhibition of cysteine proteases by a natural biflavone: behavioral evaluation of fukugetin as papain and cruzain inhibitor. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 661-670, abr. 2012. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/14756366.2012.668539>.
- BENER *et al.* Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Curcumin from *Curcuma longa* L. (Turmeric) and Evaluation of Antioxidant Activity in Multi-Test Systems. **Record of Natural Products**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 542-554, jan. 2016. Disponível em: <https://acgpubs.org/article/records-of-natural-products/2016/5-september-october/optimization-of-microwave-assisted-extraction-of-curcumin-from-curcuma-longa-l-turmeric-and-evaluation-of-antioxidant-activity-in-multi-test-systems>. Acesso em: 20 out. 2021.
- BALASUNDRAM, N.; SUDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 99, n. 1, p. 191-203, jan. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>.

BARROS NETO, B. de; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2001. 401 p.

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**, [s.l.], v. 1285, p. 22-30, abr. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.041>.

BERNARDI, C. A. **Garcinia Gardneriana (Planchon e Triana) Zappi como alternativa de anti-inflamatório tópico para o tratamento de doenças da pele: um estudo pré-clínico**. 2009. 86 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1884/26695>. Acesso em: 12 jan. 2021.

BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. **Journal of The Royal Statistical Society: Series B (Methodological)**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-45, jan. 1951. <http://dx.doi.org/10.1111/j.2517-6161.1951.tb00067.x>.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidante activity. **LWT - Food Science and Technology**, [S.L.], v.28, n. 1, p. 25-30, 1995. DOI:10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília, 2016. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf. Acesso em: 28 nov. 2020.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade**. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade>. Acesso em: 26 fev. 2021.

BUBALO, M. C. *et al.* Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 200, p. 159-166, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.040>

BUNDEESOMCHOK, K. *et al.* Extraction of α -mangostin from *Garcinia mangostana* L. using alternative solvents: computational predictive and experimental studies. **Lwt - Food Science and Technology**, [S.L.], v. 65, p. 297-303, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.036>.

CAMPOS, P. M. *et al.* Effect of a *Garcinia gardneriana* (Planchon and Triana) Zappi hydroalcoholic extract on melanogenesis in B16F10 melanoma cells. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 148, n. 1, p. 199-204, jun. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.079>.

CAO, Jun *et al.* Tailor-made hydrophobic deep eutectic solvents for cleaner extraction of polyprenyl acetates from Ginkgo biloba leaves. **Journal Of Cleaner Production**, [S.L.], v. 152, p. 399-405, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.140>.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al* (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. Cap. 20. p. 519-535.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 51, p. 15-25, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>.

CASTARDO, J. C. *et al.* Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 118, n. 3, p. 405-411, ago. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2008.05.002>.

CASTRO, A. *et al.* Potent Schistosomicidal Constituents from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Medica**, [S.L.], v. 81, n. 09, p. 733-741, 23 abr. 2015. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1545927>.

CECHINEL-FILHO, V. *et al.* 13-Narigin-II8Me-Eriodictyol: A New Potential Analgesic Agent Isolated from *Rheedia Gardneriana*. **Zeitschrift für Naturforschung. - Section C A Journal of Biosciences**, Alemanha, v. 55, n.9, p. 820-823, 2000.

CHEMAT, F. *et al.* Thermal and physical properties of (Choline chloride + urea +l-arginine) deep eutectic solvents. **Journal of Molecular Liquids**, [S.L.], v. 218, p. 301-308, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2016.02.062>.

CHEMAT, F. *et al.* Review of Alternative Solvents for Green Extraction of Food and Natural Products: panorama, principles, applications and prospects. **Molecules**, [S.L.], v. 24, n. 16, p. 3007, 19 ago. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24163007>.

CRAVEIRO, R. *et al.* Properties and thermal behavior of natural deep eutectic solvents. **Journal of Molecular Liquids**, v. 215, p. 534–540, 2016. ISSN 0167-7322, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.01.038>.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis da Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.6, 4324 p. 1984.

COSTA, F. S. *et al.* Natural deep eutectic solvent-based microwave-assisted extraction in the medicinal herb sample preparation and elemental determination by ICP OES. **Journal Of Food Composition And Analysis**, [S.L.], v. 109, p. 104510, jun. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104510>.

CUI, J. *et al.* New medicinal properties of mangostins: Analgesic activity and pharmacological characterization of active ingredients from the fruit hull of *Garcinia mangostana* L. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** v. 95, p.166–172, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.12.021>

CUI, Z. *et al.* COSMO-SAC-supported evaluation of natural deep eutectic solvents for the extraction of tea polyphenols and process optimization. **Journal of Molecular Liquids**, [S.L.], v. 328, p. 115406-115413, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115406>.

CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O. Extraction techniques with deep eutectic solvents. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 105, p. 225-239, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2018.05.001>.

DAI, Y. *et al.* Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. **Analytica Chimica Acta**, [S.L.], v. 766, p. 61-68, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>.

DAI, Y. *et al.* Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 187, p. 14-19, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.123>.

DAR R. A.; SHAHNAWAZ M.; QAZI P.H. General overview of medicinal plants: A review. **The Journal of Phytopharmacology**. India, 23 nov. 2017. Disponível em: [www.phytopharmajournal.com/ Vol6_Issue6_08](http://www.phytopharmajournal.com/Vol6_Issue6_08). Acesso em: 21 nov. 2020.

DERRINGER, G.; SUICH, R. **Simultaneous Optimization of Several Response Variables**. 1980. *Journal of Quality Technology* 12, pp. 214–219, 1980.

DOBLE, M. *et al.* KRUTHIVENTI, A. K. Alternate Solvents. In: DOBLE, M.; KRUTHIVENTI, A. K. **Green Chemistry and Engineering**. [S.L.]: Elsevier, 2007. Cap. 5. p. 93-104. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372532-5.X5000-7>.

DOLDOLOVA, K. *et al.* Optimization and modeling of microwave-assisted extraction of curcumin and antioxidant compounds from turmeric by using natural deep eutectic solvents. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 353, p. 129337, ago. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129337>.

ESPINO, M. *et al.* Green analytical chemistry metrics: towards a sustainable phenolics extraction from medicinal plants. **Microchemical Journal**, [S.L.], v. 141, p. 438-443, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2018.06.007>.

FERNÁNDEZ, M. de L. Á. *et al.* Natural deep eutectic solvents-mediated extractions: the way forward for sustainable analytical developments. **Analytica Chimica Acta**, [S.L.], v. 1038, p. 1-10, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2018.07.059>.

FERNANDEZ C. M. M. *et al.* Chemical composition and insecticidal activity of *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi (Clusiaceae) essential oil. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, [S.L.], v. 20, n. 5, p. 503-514, 30 set. 2021. MS-Editions. <http://dx.doi.org/10.37360/blacpma.21.20.5.37>.

FERREIRA, R. O.; DE CARVALHO, M. G.; DA SILVA, T. M. S. Ocorrência de biflavonoides em Clusiaceae: Aspectos químicos e farmacológicos. **Química Nova** [S.L.], v. 35, n. 11, p. 2271-2277, 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422012001100035>.

FOODB. Showing Compound Morelloflavone (FDB093560). 2019. Disponível em: <https://foodb.ca/compounds/FDB093560>. Acesso em: 20 jul. 2022.

FU, X. *et al.* Natural deep eutectic solvent enhanced pulse-ultrasonication assisted extraction as a multi-stability protective and efficient green strategy to extract anthocyanin from blueberry pomace. **Lwt**, [S.L.], v. 144, p. 111220, jun. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111220>.

GARCÍA, G. *et al.* Deep Eutectic Solvents: physicochemical properties and gas separation applications. **Energy & Fuels**, [S.L.], v. 29, n. 4, p. 2616-2644, 19 mar. 2015. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ef5028873>.

GASPAROTTO-JÚNIOR, A. *et al.* Estudo morfoanatômico das folhas e caule de *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), uma contribuição ao estudo farmacognóstico da droga vegetal. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.24, p.371-76, 2005. Disponível em: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/6757>. Acesso em 02 dez. 2020.

GEANKOPLIS, C. J. *et al.* **Transport Processes and Unit Operations**. 3. ed. New Jersey: PTR Prentice Hall, 1993. 921 p.

GONTIJO, V. S. *et al.* Isolation and evaluation of the antioxidant activity of phenolic constituents of the *Garcinia brasiliensis* epicarp. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 132, n. 3, p. 1230-1235, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.110>.

GUSTAFSON, K. R.; MCKEE T.C. The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. **Tetrahedron**, [S.L.], v. 48, n. 46, p. 10093-10102, 1992. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0040-4020\(01\)89039-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0040-4020(01)89039-6).

HAYNES, W. M. (ed.). **CRC Handbook of Chemistry and Physics**: a ready-reference book of chemical and physical data. 95. ed. Nova York: CRC Press- Taylor & Francis Group, 2014-2015. 2666 p.

HEMSHEKHAR, M. *et al.* An overview on genus garcinia: phytochemical and therapeutical aspects. **Phytochemistry Reviews**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 325-351, 25 fev. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-011-9207-3>.

IBARZ, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. **Unit operations in food engineering**. CRC Press, 2002. 889 p.

JAIN, S. K. **Medicinal plants**. 4. ed. India: National Book Trust, 2015. 216 p.

JOY P. P. *et al.* Medicinal plants. In: BOSE, T.K. *et al.* Tropical Horticulture, Naya Prokash, Calcutta, v. 2, p. 449-632, 2001.

KAENNAKAM, S.; SIRIPONG, P.; TIP-PYANG, S. Kaennacowanols A–C, three new xanthones and their cytotoxicity from the roots of *Garcinia cowa*. **Fitoterapia**, [S.L.], v. 102, p. 171-176, abr. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2015.03.008>.

KUMAR, A. K.; PARIKH, B. S.; PRAVAKAR, M. Natural deep eutectic solvent mediated pretreatment of rice straw: bioanalytical characterization of lignin extract and enzymatic hydrolysis of pretreated biomass residue. **Environmental Science and Pollution Research**, [S.L.], v. 23, n. 10, p. 9265-9275, 3 jun. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-015-4780-4>.

KUPINA, S. *et al.* Determination of Total Phenolic Content Using the Folin-C Assay: single-laboratory validation, first action 2017. 13. **Journal of AOAC International**, [S.L.], v. 101,

n. 5, p. 1466-1472, 1 set. 2018. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.5740/jaoacint.18-0031>.

LAZZAROTTO, S. R. da S. *et al.* Folin ciocalteau adapted method to quantify polyphenols in yerba mate extracts. **Revista Movimenta**, [S.I.], v. 3, n. 13, p. 419-426, 11 dez. 2020.

Disponível em:

<https://www.revista.ueg.br/index.php/movimenta/article/download/10885/8017/>. Acesso em: 28 set. 2020.

LI, A. *et al.* Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. **Nutrients**, [S.L.], v. 6, n. 12, p. 6020-6047, 22 dez. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu6126020>.

LIMA, F. *et al.* Beneficial and detrimental effects of choline chloride–oxalic acid deep eutectic solvent on biogas production. **Waste Management**, [S.L.], v. 131, p. 368-375, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2021.06.027>.

LIN, Y. *et al.* In Vitro Anti-HIV Activity of Biflavonoids Isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. **Journal of Natural Products**, [S.L.], v. 60, n. 9, p. 884-888, 1 set. 1997. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/np9700275>

LORENZI, H. 1998. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. Nova Odessa, São Paulo, vol. 1, 4ª ed. 2002. 368 p.

LOVKOVA, M. YaChemical Features of Medicinal Plants (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, [S.L.], v. 37, n. 3, p. 229-237, 2001. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1010254131166>.

LUZZI, R. *et al.* Isolation of biflavonoids with analgesic activity from *Rheedia gardneriana* leaves. **Phytomedicine**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 141-144, jun. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0944-7113\(97\)80060-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0944-7113(97)80060-8).

MA, W.; ROW, K. H. Optimized extraction of bioactive compounds from *Herba Artemisiae Scopariae* with ionic liquids and deep eutectic solvents. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, [S.L.], v. 40, n. 9, p. 459-466, 19 maio 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10826076.2017.1322522>.

MAIA, N. L. *et al.* Synergism of plant compound with traditional antimicrobials against *Streptococcus* spp. isolated from Bovine Mastitis. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 9, p. 1-10, Jun. 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01203>.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. de. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Química Nova**, [S.L.], v. 36, n. 8, p. 1248-1255, 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422013000800026>.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros, 2ª. Ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2003.

MULIA, K. et al. Selected Natural Deep Eutectic Solvents for the Extraction of α -Mangostin from Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) Pericarp. **International Journal of Technology**, [S.L.], v. 6, n. 7, p. 1211-1220, dec. 2015. ISSN 2087-2100. doi:10.14716/ijtech.v6i7.1984.

MULIA, K.; FAUZIA, F.; KRISANTI, E.A. Polyalcohols as Hydrogen-Bonding Donors in Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvents for Extraction of Xanthones from the Pericarp of *Garcinia mangostana* L. **Molecules** 2019, 24, 636. <https://doi.org/10.3390/molecules24030636>

MURATA, R. M. **Avaliação das atividades anticárie e antiproliferativa da 7-Epiclusianona isolada da planta do gênero Rheedia**. 2008. Tese (Doutorado em Odontologia). Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2008.

NALDONI, F.J. et al. Antimicrobial activity of benzophenones and extracts from the fruits of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Medicinal Food**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 403-407, abr. 2009. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2007.0622>.

NEVES, J. et al. Antianaphylactic Properties of 7-Epiclusianone, a Tetraprenylated Benzophenone Isolated from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Médica**, [S.L.], v. 73, n. 7, p. 644-649, jun. 2007. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2007-981534>.

NIERO, R. et al. Gastroprotective effects of extracts and guttiferone A isolated from *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae) against experimentally induced gastric lesions in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, [S.L.], v. 385, n. 11, p. 1103-1109, 29 ago. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-012-0788-1>.

OLIVEIRA, G.L.S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 36-44, jan-mar. 2015. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/12_165.

OTUKI, Michel F. et al. *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi. (Clusiaceae) as a Topical Anti-inflammatory Alternative for Cutaneous Inflammation. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, [S.L.], v. 109, n. 1, p. 56-62, 4 abr. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00689.x>.

PAIVA, A. et al. Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, [S.L.], v. 2, n. 5, p. 1063-1071, 26 mar. 2014. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/sc500096j>.

PAL, C. B. T; JADEJA, G. C. Deep eutectic solvent-based extraction of polyphenolic antioxidants from onion (*Allium cepa* L.) peel. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [S.L.], v. 99, n. 4, p. 1969-1979, 12 nov. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.9395>.

PARDO-ANDREU, G. L. et al. The anti-cancer agent guttiferone-A permeabilizes mitochondrial membrane: ensuing energetic and oxidative stress implications. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S.L.], v. 253, n. 3, p. 282-289, jun. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2011.04.011>.

PENA-PEREIRA, F.; NAMIEŚNIK, J. Ionic Liquids and Deep Eutectic Mixtures: sustainable solvents for extraction processes. : Sustainable Solvents for Extraction Processes. **Chemsuschem**, [s.l.], v. 7, n. 7, p. 1784-1800, 8 maio 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cssc.201301192>.

PEREIRA, I. O. *et al.* Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. **Phytomedicine**, [S.L.], v. 17, n.5, p. 339-345, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2009.07.020>.

PEREIRA, R. C.; ANGELIS-PEREIRA, M. C. de. Compostos fenólicos na saúde humana: do alimento ao organismo. **Lavras: Editora UFLA**, 2014. 90 p.

PICCINELLI, A. L., *et al.* Structural revision of clusianone and 7-epi-clusianone and anti-HIV activity of polyisoprenylated benzophenones. **Tetrahedron**, [S.L.], v. 61, n.34, p. 8206–8211, ago. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2005.06.030>.

POULI, N.; MARAKOS, P. Fused Xanthone Derivatives as Antiproliferative Agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 77-98, 1 jan. 2009. Bentham Science Publishers Ltd. <http://dx.doi.org/10.2174/187152009787047699>.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.L.], v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 26 abr. 2005. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf0502698>.

QIN, H. *et al.* Overview of acidic deep eutectic solvents on synthesis, properties and applications. **Green Energy & Environment**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 8-21, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gee.2019.03.002>.

RADOŁEVIĆ, K. *et al.* Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 112, p. 46-53, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.034>.

RECALDE-GIL, A. M. *et al.* Aromatase (CYP19) inhibition by biflavonoids obtained from the branches of *Garcinia gardneriana* (Clusiaceae). **Zeitschrift Für Naturforschung C**, [S.L.], v. 74, n. 9-10, p. 279-282, 6 ago. 2019. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/znc-2019-0036>.

RIBEIRO, B. D. *et al.* Menthol-based Eutectic Mixtures: hydrophobic low viscosity solvents. **Acs Sustainable Chemistry & Engineering**, [S.L.], v. 3, n. 10, p. 2469-2477, 24 set. 2015. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00532>.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos, Campinas: Cárita Editora. 2ª ed. 2009.

RODRIGUES, D. A. **Compostos fenólicos do bacupari (*Garcinia gardneriana*), semissíntese de novos derivados da guttiferona-a e atividade biológica**. 2019. Tese (Doutorado em Agroquímica), Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2019.

RUFINO, M. do S. M. *et al.* Metodologia Científica: **Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH**. Fortaleza: Embrapa, 2007. 4 p.

SALES, L. *et al.* Anticancer activity of 7-epiclusianone, a benzophenone *from Garcinia brasiliensis*, in glioblastoma. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 15, 2015. <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-015-0911-1>

SAMARÃO, S.S. *et al.* Estudo *in vitro* da atividade do extrato etanólico de sementes de bacupari (*Rheedia gardneriana* Planch. & Triana) e das frações no crescimento de *Streptococcus mutans*. **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v. 12, n. 2, p. 234-238, June 2010. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722010000200017>.

SANTA-CECÍLIA, F.V. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, n. 2, p. 467-473, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.09.036>

SANTA-CECILIA, F.V. *et al.* Estudo farmacobotânico das folhas de *Garcinia brasiliensis* Mart. (Clusiaceae). **Revista brasileira de plantas medicinais**, v.15, n.3, p.397-404, 2013 ISSN 1516-0572. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722013000300013>.

SANTOS, M. H. dos *et al.* 7-Epiclusianona, a nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardneriana*. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 654-660, set. 1999. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40421999000500005>.

SANTOS, M. H dos; *et al.* Efeito de constituintes químicos extraídos do fruto de *Rheedia gardneriana* (bacupari) sobre bactérias patogênicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** (Impr.), [S.L.] , v.35 n.2, p. 297-301, jul.-dez. 1999a.

SANTOS, M. H. dos; *et al.* Efeito de Constituintes Químicos Isolados da Casca do Fruto de *Rheedia gardneriana* sobre a Eclosão de Juvenis de *Meloidogyne incognita* Raça 3. **Latin American Journal of Pharmacy**. [S.L.], p. 711-714. jul. 2007. Disponível em: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/7537>. Acesso em: 13 jan. 2022.

SANTOS, M. H. dos; *et al.* **Uso de benzofenonas polipreniladas como inibidores de serino e cisteíno proteases: agentes antitumorais e anti-hiv**. Depositante: Universidade Federal de Lavras. Procurador: Soraya Helena Coelho Leite. BR n. PI 0804397-3. Depósito: 29 set. 2008. Concessão: 13 jul. 2010.

SANTOS, L. Solvente eutético profundo. **Revista de Ciência Elementar**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 1-2, 30 jun. 2017. ICETA. <http://dx.doi.org/10.24927/rce2017.021>.

SAVI, L. K. **Desenvolvimento de solventes eutéticos naturais profundos (NADES) e o estudo de suas propriedades físico-químicas, térmicas e reológicas**. 2019. 82 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

SAVITHRAMMA, N. *et. al.* Screening of medicinal plants for secondary metabolites. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 8, n. 3, p. 579-584, 2011. ISSN 1990-923.

SEBASTIÁN, S. L. Dearomatization of Antioxidant Rosemary Extracts by Treatment with Supercritical Carbon Dioxide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.47, p.13, 1998.

SILVA, J. B. **Extração e purificação de levodopa de sementes de mucuna utilizando solventes alternativos**. 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2019.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. *et al* (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. Cap. 18. p. 467-495.

SINGH R. **Medicinal Plants: A Review**. Journal of Plant Sciences. Edição especial: Medicinal Plants, v. 3, n. 1, p. 50 – 55, 2015. <http://dx.doi.org/10.11648/j.jps.s.2015030101.18>.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology e Viticulture**, [s. l], v. 16, n. 3, p. 144-158, jan. 1965. Disponível em: <https://www.ajevonline.org/content/16/3/144>. Acesso em: 13 jan. 2021.

SMITH E.L., ABBOTT, A.P., RYDER, K.S. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. **Chemical Reviews**, [S.L.], v. 114, n. 21, p. 11060-11082, 10 out. 2014. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cr300162p>.

SOARES, Sergio Eduardo. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 71-81, jan. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-52732002000100008>.

SROGI, K. A Review: application of microwave techniques for environmental analytical chemistry. **Analytical Letters**, [S.L.], v. 39, n. 7, p. 1261-1288, jun. 2006. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00032710600666289>.

TANG, B.; ZHANG, H.; ROW, K. H. Application of deep eutectic solvents in the extraction and separation of target compounds from various samples. Review Article. **Journal of Separation Science**, v. 38, p. 1053–1064, 2015.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 338-350, abr. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422006000200026>.

VAN OSCH, D. J.G.P.; *et al*. Hydrophobic deep eutectic solvents as water-immiscible extractants. **Green Chemistry**, [S.L.], v. 17, n. 9, p. 4518-4521, 2015. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c5gc01451d>.

VANDA, H. *et al*. Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents. **Comptes Rendus Chimie**, [S.L.], v. 21, n. 6, p. 628-638, jun. 2018. ISSN 1631-0748. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crci.2018.04.002>.

VERDI, L. G. *et al*. Antibacterial and brine shrimp lethality tests of biflavonoids and derivatives of *Rheedia gardneriana*. **Fitoterapia**, [S.L.], v. 75, n. 3-4, p. 360-363, jun. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2003.12.023>.

WANG, J. *et al.* Simultaneous transformation and extraction of resveratrol from *Polygonum cuspidatum* using acidic natural deep eutectic solvent. **Industrial Crops and Products**, [S.L.], v. 173, p. 114140, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114140>.

WANG, J. *et al.* Investigation of Deep Eutectic Solvent-Based Microwave-Assisted Extraction and Efficient Recovery of Natural Products. **Acs Sustainable Chemistry & Engineering**, [S.L.], v. 8, n. 32, p. 12080-12088, 17 jul. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c03393>.

WATERMAN, P. G.; CRICHTON, E. G. Xanthonés and biflavonoids from *Garcinia densivenia* stem bark. **Phytochemistry**, v. 19, n. 12, p. 2723–2726, jan. 1980.

WEB OF SCIENCE. Relatório de citações para os termos “Deep eutectic solvents” e “Natural deep eutectic solvents”. Disponível em: <https://www.webofscience.com/wos/woscc/basic-search>. Acesso em 03 mar 2022.

WELTON, T. Ionic liquids in Green Chemistry. **Green Chemistry**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 225, 2011. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c0gc90047h>.

YUNPU, W. *et al.* Review of microwave-assisted lignin conversion for renewable fuels and chemicals. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, [S.L.], v. 119, p. 104-113, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaap.2016.03.011>.

ZAN, R. A. *et al.* Bioactive properties and phytochemical assessment of Bacupari-anão (*Garcinia brasiliensis* Mart.) leaves native to Rondônia, Brazil. **Food & Function**, [S.L.], v. 9, n. 11, p. 5621-5628, 2018. Royal Society of Chemistry. <http://dx.doi.org/10.1039/c8fo01474d>.

ZHANG, Q. *et al.* Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. **Chemical Society Reviews**, [S.L.], v. 41, n. 21, p. 7108, 2012. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c2cs35178a>.

ZHAO, H.; BAKER, G. A. Ionic liquids and deep eutectic solvents for biodiesel synthesis: a review. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [S.L.], v. 88, n. 1, p. 3-12, 14 nov. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.3935>.

ZLOTORZYNSKI, Andrzej. The Application of Microwave Radiation to Analytical and Environmental Chemistry. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 43-76, set. 1995. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408349508050557>.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira *et al.* (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. Cap. 23. p. 577-614.

ZUROB, E. *et al.* Design of natural deep eutectic solvents for the ultrasound-assisted extraction of hydroxytyrosol from olive leaves supported by COSMO-RS. **Separation and Purification Technology**, [S.L.], v. 248, p. 117054, out. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117054>.

APÊNDICE A

Figura A.1 - Cromatogramas obtidos por quantificação cromatográfica (HPLC-UV) das repetições das leituras das amostras do extrato E6 (Ponto ótimo).

