

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA**

**RAFAEL PELEGRINO FURLANI**

**Abordagem verde e multiparamétrica para extração e análise de  
curcuminoides em açafrão-da-terra, utilizando Solventes eutéticos e  
bioetanol.**

**ARARAQUARA, SP**

**2021**

**RAFAEL PELEGRINO FURLANI**

**Abordagem verde e multiparamétrica para extração e análise de curcuminoides em açafrão-da-terra, utilizando Solventes eutéticos e bioetanol.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araraquara, para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rinaldo

**ARARAQUARA, SP**

**2021**

FICHA CATALOGRÁFICA

Furlani, Rafael Pelegrino

F985a      Abordagem verde e multiparamétrica para a  
extração e análise de curcuminoides em açafrão-  
da-terra, utilizando solventes eutéticos e  
bioetanol / Rafael Pelegrino Furlani. -Araraquara :  
[s.n.], 2021  
87 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual  
Paulista, Instituto de Química  
Orientador: Daniel Rinaldo

1. Química verde. 2. Produtos naturais. 3.  
Quimiometria.

4. Extração por solventes. 5. Microondas. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA  
DISSERTAÇÃO:

"Abordagem verde e multiparamétrica para extração e análise de curcuminoides em açafrão-da-terra, utilizando solventes eutéticos e bioetanol"

**AUTOR: RAFAEL PELEGRINO FURLANI**

**ORIENTADOR: DANIEL RINALDO**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela  
Comissão Examinadora:



Prof. Dr. DANIEL RINALDO (Participação Virtual)  
Departamento de Química / Faculdade de Ciências - UNESP - Bauru



Prof. Dr. CRISTIANO SOLEO DE FUNARI (Participação Virtual)  
Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrônômicas - UNESP - Botucatu



Prof.ª. Dr.ª. MIRIAM SANNOMIYA (Participação Virtual)  
Escola de Artes, Ciências e Humanidades / Universidade de São Paulo - USP - São Paulo

Araraquara, 12 de julho de 2021

## **DADOS CURRICULARES**

### **1. IDENTIFICAÇÃO**

Nome: Rafael Pelegrino Furlani

Nome em citações bibliográficas: FURLANI, R. P.; FURLANI, RAFAEL P.

Data de nascimento: 06/05/1995

Nacionalidade: Brasileiro

Naturalidade: Igaraçu do Tietê – SP

Filiação: Benedito Furlani e Elisabete Pelegrino

e-mail: rafa\_pelefur@hotmail.com

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/017951568635591>

### **2. FORMAÇÃO ACADÊMICA**

#### **1. Ensino Médio**

Etec Comendador João Rays, Barra Bonita - SP, concluído em 2012.

#### **2. Ensino Técnico**

Técnico em informática. Etec Comendador João Rays, Barra Bonita - SP, concluído em 2012.

#### **3. Ensino Superior**

Bacharel em química ambiental e tecnológica, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Bauru – SP, concluído em 2018.

### **3. ATUAÇÃO PROFISSIONAL**

Secretaria da Educação do Estado de São Paulo. Professor substituto r de ciências e matemática. Período: 02/2014 – 12/2017.

Santisa Laboratório Farmacêutico. Analista de controle de qualidade. Período: 03/2021 – presente.

### **4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA**

#### **1. ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS INDEXADOS**

SOUZA, O.A., FURLANI, R.P., RAMALHÃO, V.G.S., BORGES, M.S., FUNARI, C.S., BOLZANI, V.S., RINALDO, D. Eco-friendly and inexpensive food grade bioethanol for *Eugenia uniflora* L. chromatographic fingerprinting: a trade-off between separation and sustainability. *Phytochemistry Letters* (JCR 2019: 1,459).

### **5. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS**

#### **II Workshop INCT/Bio-Nat**

O segundo Workshop INCT/Bio-Nat foi realizado entre os dias 13 e 15 de agosto de 2019 em São Pedro, no interior de São Paulo, e trouxe pesquisadores de várias áreas e de todo o Brasil para exporem seus trabalhos recentes sobre produtos naturais.

#### **Outros**

#### **Bolsas**

07/2018 – 02/2021: Bolsista de mestrado acadêmico (CAPES).

*Dedico esse trabalho à minha família, que nos momentos mais difíceis sempre apoiaram minhas decisões, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos difíceis, e sempre acreditaram em meus sonhos. Obrigado por tudo.*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, pelo incentivo em momentos difíceis e por nunca deixarem de acreditar que eu poderia alcançar meus sonhos, mas em específico à minha mãe, que desde pequeno me mostrou a importância do conhecimento.

À minha namorada Luana, por todo carinho, suporte e compreensão nos momentos difíceis.

Ao professor Daniel pela oportunidade de se realizar este trabalho, por todos os ensinamentos e experiências novas que me proporcionou nesta fase da minha vida, por todas as horas de discussão, que sem dúvida, me fizeram chegar até aqui.

Aos antigos amigos, e aos novos amigos que apareceram durante esta jornada, aos membros do GREENSEP.

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

## RESUMO

O açafrão da terra (*Curcuma longa L*) é conhecido por sua ampla utilização na indústria de alimentos por sua coloração alaranjada característica e sua utilização em temperos, sendo uma das especiarias utilizadas no preparo do curry. O açafrão da terra também apresenta interesse farmacológico por possuir compostos bioativos, os curcuminoides. Esta série de compostos possui uma ampla faixa de atividades que despertam o interesse da indústria farmacêutica, e com isso pesquisadores de todo o mundo têm buscado entender os mecanismos de atividade e de extração desses compostos. Na busca por processos mais eficientes de extração e análise, é encontrado na literatura a utilização de solventes tóxicos nas análises e extrações dos curcuminoides. Por serem processos com potenciais aplicações industriais, a utilização rotineira desses solventes pode expor os analistas a ambientes altamente insalubres, além de gerar grandes quantidades de resíduos tóxicos. Diante disso, este trabalho desenvolveu um método de análise, por HPLC-PAD/UV-Vis, e extração de curcuminoides, por Extração Assistida por Microonda (MAE), do açafrão da terra, utilizando solventes de baixa toxicidade e sustentáveis, como bioetanol e Solventes Eutéticos Naturais Hidrofóbicos (hNADES). Para o desenvolvimento dos métodos foram utilizados planejamentos experimentais em que foi possível obter um método eficiente, com água e bioetanol como fase móvel, para análises por HPLC-PAD/UV-Vis e o hNADES Timol:Mentol (1:1,m/m), como solvente extrator por MAE. Os dois métodos desenvolvidos apresentaram maior eficiência e menor impacto quando comparados com métodos da literatura, sendo o método extrator 43% mais eficiente do que os métodos comparados.

Palavras chave: Química Verde, Produtos Naturais, Quimiometria, Extração por solventes, Microondas.

## ABSTRACT

Turmeric (*Curcuma longa* L.) is widely known for its application in food industry, for its characteristic bright orange color, and for its use in various spices, being one compound of curry. Turmeric also shows a big pharmacological interest, for having a series of bioactive compounds, known as curcuminoids. These compounds have a wide range of activities that arouse interest of the pharmacological industries, and with that, researchers from the whole world have been trying to understand its mechanisms for activity in the human body as well as its extraction from the turmeric. The search for more efficient analysis and extraction procedures leads to a scientific structure based on the utilization of toxic solvents. With potential applicability in an industrial environment, the continuous utilization of these dangerous solvents can expose analysts to highly unhealthy environments, as well generate a great amount of residues. That said, this work has developed a analysis method for curcuminoids by HPLC-PAD/UV-Vis and extraction by Microwave Assisted Extraction (MAE), using low toxicity and sustainable solvents, as bioethanol and Hydrophobic Natural Deep Eutetic Solvents (hNADES). For the development of these methods, it was applied different experimental designs, in which, it was possible to obtain a efficient method of analysis, based on water and bioethanol as mobile phases in HPLC-PAD/UV-Vis and hNADES based on Thymol and Menthol (1:1, m/m) as solvent for the MAE. Both methods showed higher efficiency and lower environment impact when compared to methods obtained from literature, as the developed solvent showed 43% higher efficiency in curcuminoid extraction.

**Keywords:** Green Chemistry, Natural Products, Chemometrics, Extraction by solvent, Microwaves.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1- Estrutura dos curcuminoides.....                                                                                                                                                                          | 19 |
| Figura 2- Estrutura dos sesquiterpenos voláteis (S.V.) mais comumente encontrados no açafrão da terra.....                                                                                                          | 22 |
| Figura 3- Comparação entre porcentagens de estudos que envolvem solventes recomendados e solventes problemáticos e indesejáveis nos processos de extração do açafrão da terra usados no período de 1992 - 2019..... | 27 |
| Figura 4- Comparação entre porcentagens de estudos que envolvem solventes problemáticos e indesejáveis e solventes recomendados para análise de compostos do açafrão da terra no período de 1992 - 2019.....        | 28 |
| Figura 5- Comparação entre diferentes técnicas de extração de curcuminoides do açafrão da terra pela comunidade científica no período de 1992 – 2019 .....                                                          | 29 |
| Figura 6- Comparação entre diferentes solventes aplicados em processos de maceração dinâmica para a extração de curcuminoides do açafrão da terra pela comunidade científica no período de 1992 - 2019.....         | 29 |
| Figura 7- Comparação entre diferentes técnicas de análise de curcuminoides do açafrão da terra pela comunidade científica no período de 1992 - 2019.....                                                            | 30 |
| Figura 8- Comparação entre diferentes solventes aplicados em processos de análise por HPLC de curcuminoides do açafrão da terra pela comunidade científica no período de 1992 - 2019.....                           | 31 |
| Figura 9- Diagrama de fases de uma mistura de dois compostos com a representação de uma mistura eutética.....                                                                                                       | 32 |
| Figura 10- Esquema de formação de um DES através da formação de uma ligação de hidrogênio.....                                                                                                                      | 33 |
| Figura 11- Cromatograma do Experimento TR4, com melhor desejabilidade global.....                                                                                                                                   | 52 |
| Figura 12 - Gráficos normais de a) probabilidade de contrastes b) porcentagem de contrastes .....                                                                                                                   | 53 |
| Figura 13- Cromatograma com maior desejabilidade para o planejamento Doehlert.....                                                                                                                                  | 57 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 14- Cromatograma obtido por HPLC-PAD e espectros UV encontrados para o grupo de curcuminoides .....                                                                                                                                                                       | 58 |
| Figura 15- Comparação entre as somas das áreas dos curcuminoides encontrados para cada mistura eutética .....                                                                                                                                                                    | 60 |
| Figura 16- Curvas de a) TG-DTA e b) DSC para as misturas eutéticas hNADES baseadas em timol:mentol e seus precursores. ....                                                                                                                                                      | 63 |
| Figura 17- Espectros FTIR das misturas eutéticas baseadas em mentol e timol. ....                                                                                                                                                                                                | 64 |
| Figura 18- Gráfico de Pareto dos efeitos obtidos como resultado das análises do planejamento de composto central (CCD). ....                                                                                                                                                     | 65 |
| Figura 19- Gráfico de superfície obtido do planejamento de CCD para os parâmetros temperatura e potência. ....                                                                                                                                                                   | 67 |
| Figura 20- Cromatograma obtido como ponto ótimo do modelo desenvolvido para a extração de curcuminoides de <i>C. longa</i> L.....                                                                                                                                                | 67 |
| Figura 21- Cromatogramas de extração assistida de micro-ondas (MAE) de curcuminoides de curcuma longa com solventes tradicionais. a) Extração com Etanol, b) Extração com c) Extração com NADES CA:GLI (1:1) proposto por LIU et al, 2019.....                                   | 69 |
| Figura 22- Comparação de técnicas de extração de curcuminoides de <i>C. longa</i> L.. ....                                                                                                                                                                                       | 70 |
| Figura 23- Pictogramas contendo os escores pela métrica AGREE para a) Método verde desenvolvido hNADES-MAE, b) Método adaptado de LI; NGADI; MA (2014) EtOH-MAE, c) Método adaptado de BENER et al (2016) MeOH-MAE; d) Método adaptado de LIU et al (2019) NADES CA:GLI 1:1..... | 72 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1- Categorias de solventes utilizadas na revisão segundo PRAT et al. 2015 .....                                                                                                  | 26 |
| Tabela 2- Variáveis estudadas no planejamento experimental fracionário para extração de curcuminoides de <i>Curcuma longa</i> L. ....                                                   | 42 |
| Tabela 3- Planejamento fatorial fracionário 2v5-1 .....                                                                                                                                 | 42 |
| Tabela 4- Planejamento Doehlert de 3 variáveis .....                                                                                                                                    | 43 |
| Tabela 5- NADES e hNADES preparados .....                                                                                                                                               | 44 |
| Tabela 6- Planejamento experimental de composto central com 4 variáveis para otimização da extração por MAE utilizando hNADES#13 .....                                                  | 46 |
| Tabela 7- Resultados de GCF, Resolução Média e desejabilidade dos planejamentos fatoriais fracionários para cada coluna cromatográfica estudada .....                                   | 50 |
| Tabela 8- Planejamento Doehlert de 3 variáveis com valores codificados e reais .....                                                                                                    | 55 |
| Tabela 9- - Análise de variância por ANOVA para o modelo cromatográfico verde de análise de curcuminoides de <i>Curcuma longa</i> L. ....                                               | 56 |
| Tabela 10- Experimentos de reprodutibilidade da melhor condição cromatográfica determinada para o método verde desenvolvido para análises de extratos de <i>C. longa</i> por HPLC ..... | 57 |
| Tabela 11- Curcuminoides identificados do extrato hidroalcoólico de <i>C. longa</i> por LC-PAD-MS .....                                                                                 | 59 |
| Tabela 12- Valores médios de área total de curcuminoides obtidos nas extrações com as misturas eutéticas. ....                                                                          | 60 |
| Tabela 13- Área total de curcuminoides obtidos nos experimentos de CCD ..                                                                                                               | 66 |
| Tabela 14- Condições ótimas determinadas para a extração de curcuminoides de <i>Curcuma longa</i> L. por MAE utilizando hNADES#13 como solvente. ....                                   | 66 |
| Tabela 15- Análise de variância por ANOVA para o modelo de extração de curcuminoides de <i>Curcuma longa</i> L. com hNADES#13. ....                                                     | 68 |
| Tabela 16- Comparação entre os métodos de extração da literatura e o método desenvolvido para a extração de curcuminoides de <i>C. longa</i> . ....                                     | 70 |

Tabela 17- Valores obtidos pela métrica AGREE para os métodos desenvolvidos .....71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

|                 |                                                                                                                                                           |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ANOVA           | Análise de variância                                                                                                                                      |
| °C              | Graus célcus                                                                                                                                              |
| C <sub>18</sub> | Fase estacionária de fase reversa do tipo Octadecilsilano                                                                                                 |
| bMDC            | Bis-demetóxicurcumina                                                                                                                                     |
| C               | Contraste entre variáveis do planejamento experimental de primeira ou segunda ordem                                                                       |
| CCD             | Planejamento de composto central                                                                                                                          |
| cm              | Centímetros                                                                                                                                               |
| CP              | Experimentos realizados em réplicas em planejamento de experimentos, em forma de pontos centrais (Central Points)                                         |
| CUR             | Curcumina                                                                                                                                                 |
| DES             | Solventes eutéticos profundos ( <i>Deep Eutetic Solvents</i> )                                                                                            |
| DMC             | Demetóxicurcumina                                                                                                                                         |
| DO              | Experimentos realizados através do planejamento Doehlert                                                                                                  |
| DPR             | Desvio Padrão Relativo                                                                                                                                    |
| DSC             | Calorimetria Diferencial Exploratória ( <i>Differential Scanning Calorimetry</i> )                                                                        |
| EtOH            | Etanol                                                                                                                                                    |
| FP              | Parte da equação utilizada para o <i>fingerprinting</i> de <i>C. longa</i> . Representa a seção do Cromatograma com o menor número de bandas encontradas. |
| FTIR            | Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier                                                                                               |
| g               | Gramas                                                                                                                                                    |
| GAC             | Química Analítica Verde ( <i>Green Analytic Chemistry</i> )                                                                                               |
| GCF             | Resposta utilizada para elaboração do <i>fingerprinting</i> de <i>C. longa</i> ( <i>Green Chromatographic Fingerprinting</i> ).                           |
| GC-MS           | Cromatografia gasosa com espectrômetro de massas ( <i>Gas chromatography equipped with mass spectrometer</i> )                                            |
| HAc             | Ácido acético                                                                                                                                             |
| HBA             | Aceptor de ligações de hidrogênio                                                                                                                         |
| HBD             | Doador de ligações de hidrogênio                                                                                                                          |

|                 |                                                                                                                                                                     |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| hNADES          | Solventes eutéticos naturais profundos hidrofóbicos ( <i>Hydrophobic Natural Deep Eutetic Solvents</i> ).                                                           |
| HPLC-PAD        | Cromatografia líquida de alta eficiência equipada com detector amperométrico de pulso                                                                               |
| IL              | Líquidos iônicos                                                                                                                                                    |
| LC-MS           | Cromatografia líquida com espectrômetro de massas ( <i>Liquid chromatography equipped with mass spectrometer</i> )                                                  |
| LTTM            | Mistura de baixa temperatura de transição ( <i>Low Temperature Transition Mixtures</i> )                                                                            |
| MAE             | Extração assistida de micro-ondas ( <i>Microwave-assisted extraction</i> )                                                                                          |
| MeOH            | Metanol                                                                                                                                                             |
| mg              | Microgramas                                                                                                                                                         |
| min             | Minutos                                                                                                                                                             |
| ml              | Mililitros                                                                                                                                                          |
| m/z             | Razão massa/carga                                                                                                                                                   |
| MP              | Parte da equação utilizada para o cálculo do <i>fingerprinting</i> de <i>C. longa</i> . Representa a seção do cromatograma com o maior número de bandas encontradas |
| NADES           | Solventes eutéticos naturais profundos ( <i>Natural Deep Eutetic Solvents</i> )                                                                                     |
| nm              | Nanômetros                                                                                                                                                          |
| OMS             | Organização Mundial da Saúde                                                                                                                                        |
| PTFE            | Politetrafluoroetileno                                                                                                                                              |
| R <sub>cn</sub> | Resolução de cada banda cromatográfica encontrada no leito cromatográfico                                                                                           |
| RMN             | Ressonância Magnética Nuclear                                                                                                                                       |
| rpm             | Rotações por minuto                                                                                                                                                 |
| RSM             | Metodologia de Superfície de Resposta ( <i>Response Surface Methodology</i> )                                                                                       |
| S.V.            | Sesquiterpenos voláteis                                                                                                                                             |
| TG              | Termogravimetria                                                                                                                                                    |
| TLC             | Cromatografia de camada delgada ( <i>Thin Layer Chromatography</i> )                                                                                                |
| TR              | Experimentos realizados durante a triagem de variáveis no                                                                                                           |

|        |                                                                                         |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
|        | planejamento fatorial fracionário                                                       |
| tR     | Tempo de retenção das análises cromatográficas                                          |
| UAE    | Extração assistida de ultrassom (Ultrassound-assisted extraction)                       |
| UHPLC  | Cromatografia líquida de ultra eficiência (Ultra-high efficiency liquid chromatography) |
| UV-Vis | Região do espectro eletromagnético ultravioleta-visível                                 |
| VOCs   | Compstos Orgânicos Voláteis (Volatile Organic Compounds)                                |
| W      | Watts                                                                                   |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.INTRODUÇÃO.....                                                                                                                                         | 20 |
| 1.1 Açafrão da terra e seus curcuminoides .....                                                                                                           | 20 |
| 1.2 A Química Verde e Química Analítica Verde e sua importância para o desenvolvimento de uma ciência sustentável .....                                   | 25 |
| 1.3 Um olhar aprofundado sobre a utilização do açafrão da terra em processos laboratoriais rotineiros .....                                               | 26 |
| 1.4 Solventes Eutéticos Naturais Profundos (NADES), como uma nova tendência para a extração de compostos de interesse de matrizes naturais complexas..... | 33 |
| 1.5 Extração Assistida por Microondas ( <i>Microwave-assisted extraction</i> , MAE) .....                                                                 | 39 |
| 2.OBJETIVOS.....                                                                                                                                          | 41 |
| 2.1 Estratégias lógicas para se alcançar os objetivos propostos .....                                                                                     | 41 |
| 3. MATERIAIS E METODOLOGIAS.....                                                                                                                          | 42 |
| 3.1 Materiais utilizados .....                                                                                                                            | 42 |
| 3.2 Instrumentação utilizada .....                                                                                                                        | 42 |
| 3.3 Preparo das amostras .....                                                                                                                            | 43 |
| 3.4 Cálculos estatísticos .....                                                                                                                           | 44 |
| 3.5 Desenvolvimento do método cromatográfico verde a partir de uma abordagem multiparamétrica e multivariada .....                                        | 44 |
| 3.6 Preparação das misturas eutéticas NADES e hNADES .....                                                                                                | 47 |
| 3.7 Processo de extração em micro-ondas (MAE) .....                                                                                                       | 48 |
| 3.8 Planejamento de composto central (CCD) com hNADES #13 por MAE ...                                                                                     | 48 |
| 3.9 Reprodução (adaptada) de métodos da literatura de extração de curcuminoides de <i>Curcuma longa</i> L. ....                                           | 50 |
| 3.10 Análises térmicas e caracterização espectroscópica da mistura eutética.                                                                              | 51 |

|                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.11 Coerência dos métodos desenvolvidos com os princípios da Química Analítica Verde.....                                                              | 51 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....                                                                                                                        | 53 |
| 4.1 Determinação dos principais parâmetros cromatográficos por Planejamento Fatorial Fracionário $2_v^{5-1}$ .....                                      | 53 |
| 4.2 Ajuste das variáveis mais importantes (Planejamento Doehlert) e calculo do modelo matemático para o método cromatográfico verde do sistema HPLC ... | 57 |
| 4.3 Testes de reprodutibilidade do melhor resultado empírico .....                                                                                      | 60 |
| 4.4 Identificação dos compostos de interesse por LC-PAD-MS e HPLC-PAD .                                                                                 | 61 |
| 4.5 Triagem dos NADES para extrações dos curcuminoides por MAE .....                                                                                    | 62 |
| 4.6 Caracterizações térmicas das misturas eutéticas hNADES#13 e hNADES#14 .....                                                                         | 65 |
| 4.7 Caracterização espectroscópica das misturas eutéticas hNADES#13 e hNADES#14 compostas por Mentol e Timol .....                                      | 66 |
| 4.8 Otimização dos parâmetros de extração dos curcuminoides pelo hNADES#13 por MAE .....                                                                | 68 |
| 4.9 Comparação entre os métodos da literatura com o método otimizado para a extração de curcuminoides com hNADES#13 .....                               | 71 |
| 4.9 A métrica AGREE ( <i>Analytical GREENess</i> ) como indicativo do potencial verde dos métodos desenvolvidos.....                                    | 74 |
| 5 CONCLUSÕES .....                                                                                                                                      | 78 |
| REFERÊNCIAS.....                                                                                                                                        | 80 |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Açafrão da terra e seus curcuminoides

O açafrão da terra (*Curcuma longa* L.), também conhecido apenas por cúrcuma, é um membro da família Zingiberacea, uma das maiores de sua ordem, Zingiberales, sendo cultivada amplamente em regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo, com relatos de seu uso em práticas medicinais que apontam para o século I da Era Antiga, o que corresponde há cerca de 7 mil anos atrás, sendo um dos principais constituintes da medicina *Āyurveda*, uma das primeiras práticas medicinais desenvolvidas em todo o mundo (BIANCHINI; POSSEBON, 2014). *Āyurveda* significa, em sânscrito, ciência (*veda*) da vida (*ayur*), e é conhecida como a mãe da medicina, uma vez que deu origem às práticas medicinais chinesas, gregas e romanas, que posteriormente, ganharam reconhecimento por diversas técnicas medicinais em relação ao tratamento de enfermidades por meio de plantas. Neste período, o uso de açafrão da terra era comum para o tratamento de diversas doenças do fígado e para a manutenção da higiene oral (SCHOLZE, 2014).

O período de desenvolvimento das primeiras práticas e sistemas medicinais da história, como a *Āyurveda*, foi marcado pela utilização de plantas como tratamento para os mais variados tipos de enfermidades, fazendo com que os homens, se voltassem à natureza, em busca de respostas e medicamentos. O desenvolvimento destas práticas caracteriza-se como um conhecimento empírico, passado de geração em geração dos primeiros curandeiros. Desta forma, é possível se traçar um paralelo entre o desenvolvimento da sociedade humana, e a utilização de algumas plantas, entre elas o açafrão da terra. A espécie em questão, mostra um laço tão forte à espécie humana, que, nos dias de hoje, não é mais encontrada nenhum exemplar selvagem de açafrão da terra na natureza, indicando que populações desta espécie estejam restritas a áreas de desenvolvimento humano (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

Esta forte ligação pode ser ressaltada ainda mais ao se observar as ingestões diárias curcuminoides, os compostos majoritários presentes no açafrão da terra, em países que apresentam um laço cultural da utilização desta espécie, como a Índia. A Organização Mundial da Saúde (OMS) indica uma ingestão diária de curcuminoides de 0 a 3mg/kg, enquanto a ingestão de açafrão da terra na dieta indiana é de aproximadamente de 2 a 2,5g por dia para um indivíduo de 60Kg, o que corresponde a uma ingestão diária de aproximadamente 60 a 100 mg de curcumina, denotando a forte presença desse composto na cultura regional (AMALRAJ *et al.*, 2017).

O açafrão da terra pode ser encontrado comercialmente em três formas distintas. Entre estas, as mais utilizadas nas indústrias alimentícias e farmacêuticas para fins de extração de compostos de interesse, por exemplo, são as rizomas e o pó das rizomas, que contêm os compostos de interesse em maior quantidade.

A cúrcuma tem sido usada por muito tempo em culturas indianas e chinesas como colorantes alimentícios, sendo a base para temperos como o curry (uma mistura de especiarias e temperos que, na maioria das vezes, consiste de açafrão da terra, cravo, páprica, gengibre, cardamomo, coentro, cominho, pimenta e canela) e outras mostardas, e também para fins medicinais, onde possui uma ampla gama de atividades (AMALRAJ *et al.*, 2017; SCHOLZE, 2014; SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

O aspecto terapêutico do açafrão da terra está relacionado com a presença de um grupo conhecido como curcuminoides (Figura 1).

Entre as atividades farmacológicas conhecidas pela comunidade científica, encontram-se ações antioxidantes, antiprotozoárias, antivenenosas, antimicrobianas, antimaláricas, anti-inflamatórias, antiproliferativas, antiangiogênicas, antitumorais e antienvhecimento. A cúrcuma tem sido usada também, para o tratamento de úlceras, infecções parasíticas, várias doenças de pele, doenças autoimunes e tratamento de doenças sexualmente transmissíveis (AMALRAJ *et al.*, 2017; BROUET; OHSHIMA, 1995;

CALCAGNO *et al.*, 2019; PRIYADARSINI, 2014; RAJAKUMAR; RAO, 1994; SCHOLZE, 2014; SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

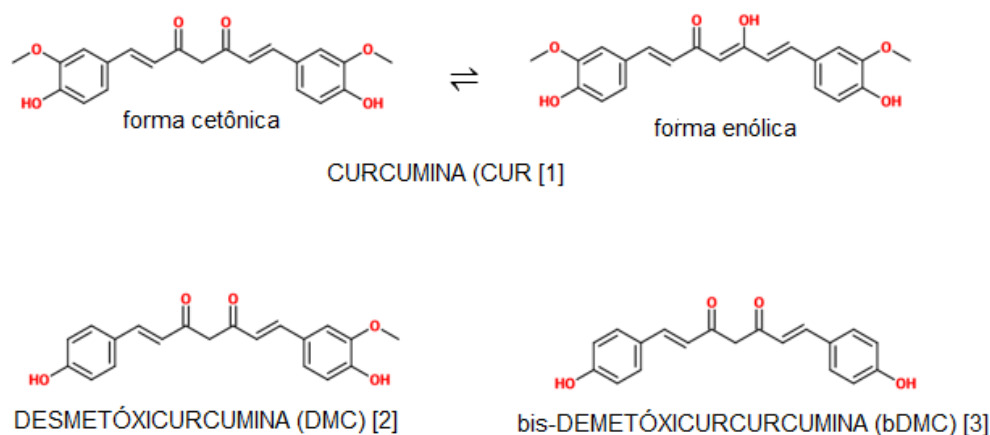


Figura 1- Estrutura dos curcuminoides

Atualmente, a conhecida atividade biológica do açafrão da terra é devida principalmente aos curcuminoides, um grupo de compostos fenólicos de cor dourado-alaranjada, sem nenhuma contraindicação conhecida. Entre este grupo de compostos, a curcumina (CUR), é o composto majoritário, com cerca de 75 a 80% da composição total de curcuminoides nas raízes e nas rizomas da planta. Mais recentemente, no entanto, atividades semelhantes àsquelas anteriormente apenas empregada a curcumina, podem ser encontradas nas duas outras estruturas, a demetóxicurcumina (DMC) e a bis-demetóxicurcumina (bDMC), fazendo destas estruturas também, compostos-alvo para o desenvolvimento de novos fármacos, de mesmo impacto que o composto principal (AHSAN *et al.*, 1999).

Entre todas as atividades do grupo de curcuminoides descritas anteriormente, a atividade anticâncer têm sido extensivamente investigada nos últimos anos, sugerindo um potencial papel tanto para a prevenção quanto para o tratamento de uma grande variedade de cânceres, incluindo gastrointestinal, de mama e de pulmão, uma vez que os curcuminoides suprimem a formação de espécies mutagênicas e podem levar células danificadas a apoptose (CALCAGNO *et al.*, 2019). Outra característica que favorece o potencial

anticâncer é que os curcuminoides apresentam um forte potencial quelante com metais como  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  e podem ser utilizadas como carregadores farmacêuticos em tratamentos contra o câncer e patologias provindas da deficiência de ferro (FERRARI *et al.*, 2013).

Quanto às propriedades físico-químicas destes compostos, como pode ser visto na Figura 1, uma grande similaridade estrutural é encontrada nestas moléculas, sendo estas formadas, por um grupo aromático metóxi, um conector insaturado com duas carbonilas e um tautomerismo ceto-enólico. A hidrofobicidade desses compostos pode ser identificada nas estruturas, sendo provindas dos grupos aromáticos presentes. Estruturas tautoméricas também influenciam na hidrofobicidade dos três compostos, também em sua polaridade, e por consequência, bioatividade, fazendo com que esses compostos sejam pouco solúveis em água (PRIYADARSINI, 2014; SCHOLZE, 2014; SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015; TØNNESEN, 1992).

Esta característica, no entanto, faz com que estes compostos não sejam absorvidos completamente pelo organismo humano, o que leva ao pouco uso de formulações contendo estas estruturas na medicina atual. Entretanto, estratégias eficientes têm sido encontradas para aumentar a absorção destes compostos no organismo, alcançando resultados satisfatórios em formulações sintéticas baseadas nas estruturas dos curcuminoides, mantendo sua atividade farmacológica, alterando suas propriedades cinéticas no organismo (PURPURA *et al.*, 2018) e, também, na administração de curcuminoides com piperina, um composto proveniente da pimenta preta (*Piper nigrum*) que, quando aplicados concomitantemente, alcançam uma absorção 2000% maior do que com curcuminoides administrados isoladamente (SHOBA *et al.*, 1998).

O açafrão da terra apresenta outro grupo de compostos de interesse para a indústria de óleos essenciais e perfumaria que são os sesquiterpenos (Figura 2), responsáveis pelo o aroma característico do açafrão da terra. Suas composições na matriz variam de acordo a espécie da planta, em uma série de compostos. Entre os mais conhecidos encontram-se:  $\alpha$ -felandreno (1), turmerona (2), curlona (3), curcufenol (4), terpineol (5) e linalol (6). A maioria desses compostos estão presentes em maior concentração nas folhas e menor

concentração nas rizomas e nas raízes, enquanto apenas a turmerona (2) apresenta uma grande concentração nas rizomas, cerca de 46,8% da composição total (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

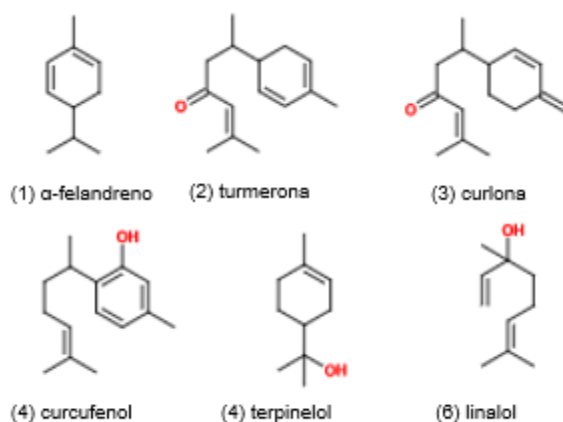


Figura 2- Estrutura dos sesquiterpenos voláteis (S.V.) mais comumente encontrados no açafrão da terra.

Por se tratar de uma planta com diversos tipos de aplicações, e em diversas áreas, o estudo do açafrão da terra ganha ainda mais profundidade e importância ao se identificar a forte relação que essa espécie tem com o desenvolvimento de diversas culturas em nossa sociedade. Desde a separação da curcumina do pó do açafrão da terra, que foi reportado em 1815, métodos mais avançados de extração ainda estão sendo estudados na busca de um melhor rendimento na obtenção dos curcuminoides.

Com essa busca por melhores rendimentos de curcuminoides e por essas substâncias possuírem caráter hidrofóbico, muitos processos que demandam muitas etapas e utilizam substâncias tóxicas como solventes extratores, que geram a acumulação de resíduos tóxicos e riscos à saúde dos analistas. Com o aumento da demanda por extração de curcuminoides, esses processos podem ser custosos do ponto de vista energético e gerar sérios danos ao meio ambiente (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013; ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2015; FUNARI *et al.*, 2014).

Portanto, abordagens mais verdes que não utilizam substâncias tóxicas e menor consumo de energia e tempo, mantendo ou aumentando o rendimento dos curcuminoides nas extrações, podem ser mais seguras e menos custosas. A aplicação dessas abordagens torna-se possível com a aplicação dos princípios da Química Verde e da Química Analítica Verde.

## **1.2 A Química Verde e Química Analítica Verde e sua importância para o desenvolvimento de uma ciência sustentável**

Propostos em 1998 por Anastas e Warner, os doze princípios da química verde foram formulados para servir como uma linha de base para o que pode ser entendido como uma nova estrutura de desenvolvimento científico, onde pesquisadores desta área buscam resultados parecidos ou ainda superiores baseando-se nestes princípios em comparação com os métodos tradicionais de extração de compostos de matrizes naturais, que geralmente utilizam-se de solventes perigosos (ANASTAS, P.T., WARNER, 1998; CHEMAT *et al.*, 2019; LENARDÃO *et al.*, 2003).

Derivada da Química Verde, a Química Analítica Verde (GAC) abrange a filosofia da Química Verde em processos analíticos, pois esses processos, de modo similar à química sintética, também podem causar danos consideráveis ao meio ambiente, principalmente na geração de resíduos (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013). Esforços têm sido feitos para reduzir o impacto negativo de análises químicas ao meio ambiente e para facilitar a implementação de práticas de desenvolvimento sustentável em laboratórios analíticos. De maneira similar a Química Verde (GC), a Química Analítica Verde (GAC) propõe seus 12 princípios de desenvolvimento científico:

1. Técnicas de análises diretas devem ser aplicadas para se evitar o tratamento de amostras.
2. Quantidades mínimas de amostras devem ser avaliadas.
3. Medidas *in situ* são preferíveis.

4. Integração de processos analíticos e operações gastam menos recursos energéticos e devem ser performados ante a análises isoladas.
5. Processos automatizados e miniaturizados devem ser desenvolvidos.
6. A derivação da amostra deve ser evitada.
7. Geração de grandes quantidades de resíduos em processos analíticos devem ser evitados, e todo resíduo deve ser tratado corretamente.
8. Métodos multi-analito e multi-variável são preferíveis.
9. O uso de recursos energéticos deve ser o mínimo.
10. Reagentes obtidos de fontes renováveis devem ser preferidos.
11. Reagentes tóxicos devem ser substituídos ou eliminados.
12. A segurança do operador deve ser aumentada.

### **1.3 Um olhar aprofundado sobre a utilização do açafraão da terra em processos laboratoriais rotineiros**

De modo similar à busca de novas tecnologias e métodos laboratoriais mais eficientes, a comunidade científica, nos últimos anos, se volta aos seus métodos clássicos e rotineiros, buscando entender mais profundamente o impacto ambiental que estes causam tanto ao meio ambiente em geral quanto à saúde de seus operadores (CHEMAT *et al.*, 2019).

Uma das etapas mais poluidoras, e quase insubstituível dos métodos analíticos é a extração. No processo de extração, além da busca por eficiência, deseja-se que os solventes extratores possuam maior pressão de vapor para facilitar a etapa de secagem do extrato, sendo estes solventes conhecidos por VOCs (compostos orgânicos voláteis) que são tóxicos (VIAN *et al.*, 2017).

Estima-se que milhões de litros de resíduos tóxicos são gerados todos os anos pelos laboratórios ao redor do mundo (ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2015; FUNARI *et al.*, 2014). Esse fato pode estar relacionado com a utilização de antigos protocolos consolidados.

Assim, o desenvolvimento de novos protocolos que visam à substituição desses solventes tóxicos por outros de menor ou nenhuma toxicidade poderia não só assegurar a saúde dos analistas como, também, reduzir os custos dos procedimentos extrativos devido à redução de etapas e geração de resíduos tóxicos. Estes conceitos deram origem a princípios que formulam uma nova estrutura de desenvolvimento científico, preocupada com o bem-estar e segurança do operador, em conjunto com a busca de menores taxas de poluição, menor geração de resíduos e demandas energéticas. Devido a esses fatos, a química verde vem ganhando espaço na comunidade científica nos últimos anos ao propor princípios de desenvolvimento científico sustentável e não prejudicial (ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2015; CHEMAT *et al.*, 2019; VIAN *et al.*, 2017) .

Tendo como objetivo uma melhor compreensão das técnicas e de solventes utilizados pela comunidade científica nas últimas décadas para procedimentos de rotina laboratorial do açafrão da terra (como extrações e análises), uma revisão bibliográfica foi desenvolvida, do período de 1992, sendo este o ano conhecido como o ano do nascimento da Química Verde, bem como da realização da ECO 92, uma cúpula realizada na cidade do Rio de Janeiro que juntou chefes de Estado de diversos países para tratar sobre assuntos do meio ambiente, até 2019.

Foi se levantada, nesta revisão, informações de diferentes técnicas e processos aplicados para a análise e para a extração de curcuminoides do açafrão da terra, e estes dados, posteriormente, foram agrupados para uma melhor comparação de cada característica estudada.

A revisão mencionada foi realizada com os dez estudos mais relevantes de cada ano que envolviam o termo “extração de curcuminoides” (*curcuminoid extraction*) em diferentes agregadores de artigos científicos, onde a relevância de cada estudo foi avaliada caso a caso, uma vez que artigos científicos com mais aplicabilidade, mais descrição das atividades realizadas, e com mais citações foram priorizados.

Nesta revisão, os estudos foram separados pelas características dos solventes utilizados em seus processos de extrações, em cinco grandes categorias, de acordo com PRAT *et al.*, 2015, que se utiliza de critérios de segurança, saúde e meio ambiente, alinhado às recomendações europeias de aplicabilidade destes compostos (Tabela 1), sendo os solventes recomendados classificados por PRAT *et al.*, 2015 como seguros na aplicação em processos rotineiros, com menor impacto para o meio ambiente e para o analista (em tons de verde) e em solventes problemáticos e indesejáveis, classificados como solventes tóxicos, prejudiciais e danosos ao operador e ao meio ambiente em sua volta, (em tons de amarelo e vermelho) incluindo categorias intermediárias para estas classes. Quanto ao emprego de cores na revisão efetuada, foram aplicadas tonalidades diferentes para representar a classificação proposta por PRAT *et al.*, 2015, em solventes pertencentes a mesma categoria, portanto, tons mais fracos representam solventes menos perigosos e mais recomendados, enquanto tons mais fortes e mais vibrantes representam solventes mais perigosos.

Tabela 1- Categorias de solventes utilizadas na revisão segundo PRAT *et al.* 2015

| Classificação do Solvente  | Exemplos                                                                                                        |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Recomendados               | Água, Etanol isopropanol, n-butanol, acetato de etila, etanoato de butila, anisol, sulfolano                    |
| Recomendados/Problemáticos | Metanol, t-butanol, álcool benzílico, etilenoglicol, acetona, ciclohexanona, acetato de metila                  |
| Problemáticos              | Metiltetraidrofurano, heptano, metilciclohexano, tolueno, xilenos, clorobenzeno, acetonitrila, dimetilsulfóxido |
| Problemáticos/Perigosos    | Éter metil-tert-butílico, tetraidrofurano, ciclohexano, ácido fórmico, piridina, diclorometano                  |
| Perigosos                  | Diisopropil éter, 1,4-dioxano, pentano, hexano, dimetilformamida, dimetilacetamida, trietilamina                |
| Extremamente Perigosos     | Dietil éter, benzeno, clorofórmio, tetracloreto de carbono, nitrometano, hexametiltriâmina fosfórica            |
| Não classificados*         | Líquidos iônicos                                                                                                |

\*Solventes que não apareceram no estudo de referência de PRAT *et al.*, 2015, mas foram encontrados ao longo da revisão de dados levantada entre 1992 e 2019.

A primeira parte de todo processo analítico que foi estudada nesta revisão, foram os solventes utilizados nos processos de extração de curcuminoides do açafrão da terra, onde os solventes utilizados nos artigos científicos selecionados foram agrupados de acordo com as classificações de PRAT *et al.*, 2015, em solventes recomendados e solventes problemáticos ou perigosos.

Na figura 3 é possível se observar que, no caso do açafrão-da-terra, mostra-se uma diminuição significativa na utilização de solventes indesejáveis ao longo dos anos nos processos de extração de compostos de interesse, levando a uma completa eliminação desses solventes nos últimos anos englobados pela revisão, o que pode estar relacionado com uma crescente preocupação dos pesquisadores com questões ambientais e bem-estar dos analistas. No entanto, os dados levantados à respeito a outra parte do processo analítico, de igual importância e impacto ambiental, mostra que os processos de análise de extrato do açafrão-da-terra, realizados por HPLC, não mostra um resultado de similar significância para o desenvolvimento de uma química verde e sustentável, uma vez que a diminuição da utilização de solventes problemáticos não foi tão proeminente, sendo os solventes problemáticos os majoritários em todos os biênios analisados (Figura 4).



Figura 3- Comparação entre porcentagens de estudos que envolvem solventes recomendados e solventes problemáticos e indesejáveis nos processos de extração do açafrão da terra usados no período de 1992 - 2019. Fonte: Autor.

O resultado encontrado para os processos de análise de curcuminoides, de maneira contrária ao obtido na análise dos processos de extração dos compostos de interesse do açafrão da terra, indica que a etapa de análise de compostos ainda é problemática dentro do desenvolvimento científico e que essa etapa deve ser tratada com mais atenção pelos pesquisadores, denotando uma resistência da comunidade científica na substituição dos solventes tradicionais de análises por cromatografia líquida, como acetonitrila e metanol, por solventes menos tóxicos e poluentes, como o etanol, por exemplo.



Figura 4- Comparação entre porcentagens de estudos que envolvem solventes problemáticos e indesejáveis e solventes recomendados para análise de compostos do açafrão da terra no período de 1992 - 2019. Fonte: Autor.

O emprego de solventes como acetonitrila e metanol, no entanto, é justificado pela comunidade científica pela absorção em baixos comprimentos de onda, fazendo com que, nenhuma interferência destes compostos na análise. Destaca-se também, a baixa viscosidade destes compostos, tornando-os de aplicação mais rápida e fácil, quando comparado a utilização de etanol como fase móvel, que apresenta característica viscosidade quando misturado com água para utilização como fase móvel de cromatografia líquida de alta eficiência, por exemplo (WELCH *et al.* 2009).

No entanto, deve-se destacar o papel que estes solventes apresentam em procedimentos consolidados para análise, uma vez que a utilização desmedida destes solventes implica em uma maior geração de resíduos tóxicos tanto para o meio ambiente, como para a saúde humana (ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2015; CHEMAT *et al.*, 2019; VIAN *et al.*, 2017; PRAT *et al.*, 2015)

Um olhar aprofundado às técnicas de extração e de análise de cada artigo científico selecionado fez-se ideal para uma melhor identificação da utilização de diferentes solventes e técnicas nestes processos pela comunidade científica com o passar dos anos.

Sobre os processos de extração (Figura 5), observou-se o uso majoritário da técnica de maceração dinâmica para a extração de curcuminoides do açafrão da terra, e uma análise aprofundada nos solventes aplicados a estes processos (Figura 6), ressalta a grande aplicabilidade de solventes verdes em sua maioria, enquanto ao mesmo tempo, ressalta-se a importância da substituição de solventes de potencial negativo para o meio ambiente, uma vez que uma parcela significativa dos solventes aplicados neste tipo de técnica, pode ser considerada perigosa, sendo provinda da utilização de hexano nestes processos.

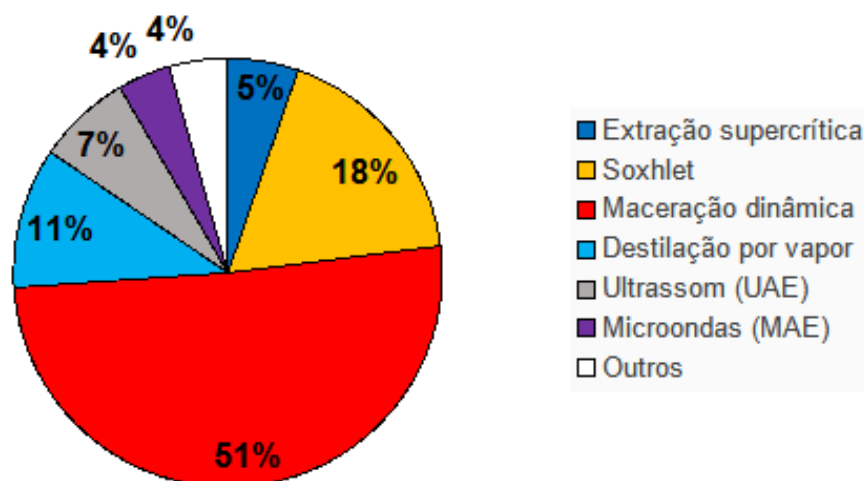


Figura 5- Comparação entre diferentes técnicas de extração de curcuminoides do açafrão da terra pela comunidade científica no período de 1992 - 2019. Fonte: Autor.

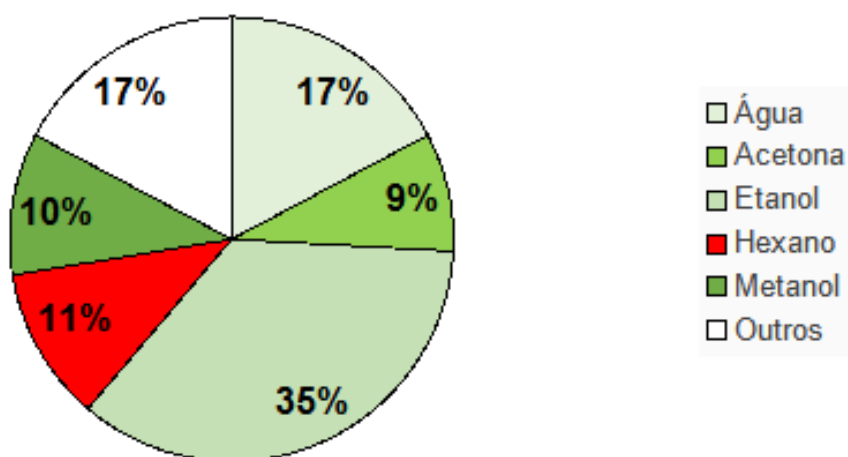
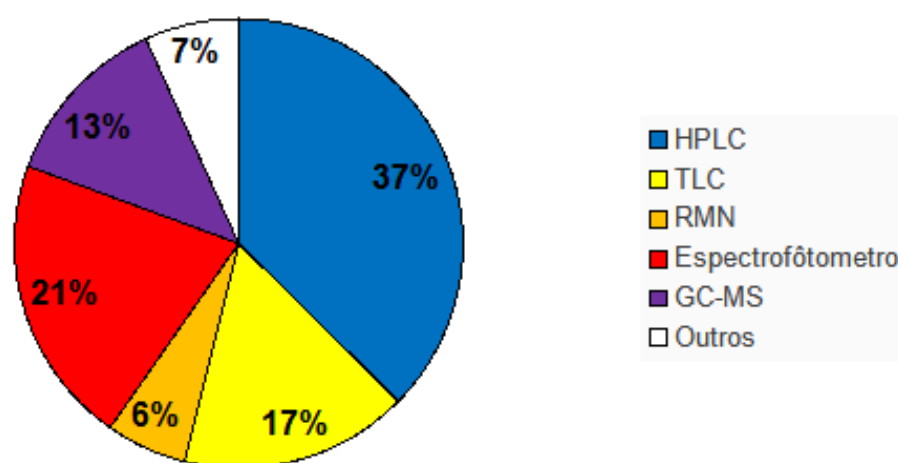


Figura 6- Comparação entre diferentes solventes aplicados em processos de maceração dinâmica para a extração de curcuminoides do açafrão da terra pela comunidade científica no período de 1992 - 2019. Fonte: Autor.

De maneira similar ao resultado obtido para as técnicas de extração, uma grande variedade de técnicas de análise de extratos de *Curcuma longa* L. foi encontrada (Figura 7), sendo que a maior parte dos resultados, envolve detecção dos compostos supracitados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), sendo uma estratégia conhecida de separação destes compostos, onde a maioria dos empregos desta técnica utiliza-se de procedimentos em fase reversa (PRIYADARSINI, 2014; JADHAV; MAHADIK; PARADKAR, 2007; MONDAL; GHOSH; MOULIK, 2016).

Quanto aos solventes utilizados nestes processos de análise (Figura 8), foi identificada a grande aplicabilidade de solventes problemáticos para identificação e quantificação destes compostos. Deve-se ressaltar, que embora estes solventes, não sejam categorizados como perigosos, a grande quantidade de solventes que estas análises demandam, tornam esses procedimentos ainda mais questionáveis pela ótica da Química Verde



(ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2015; FUNARI *et al.*, 2014; PRAT *et al.*, 2015 WELCH *et al.* 2009).

Figura 7- Comparação entre diferentes técnicas de análise de curcuminoides do açafrão da terra pela comunidade científica no período de 1992 - 2019. Fonte: Autor.

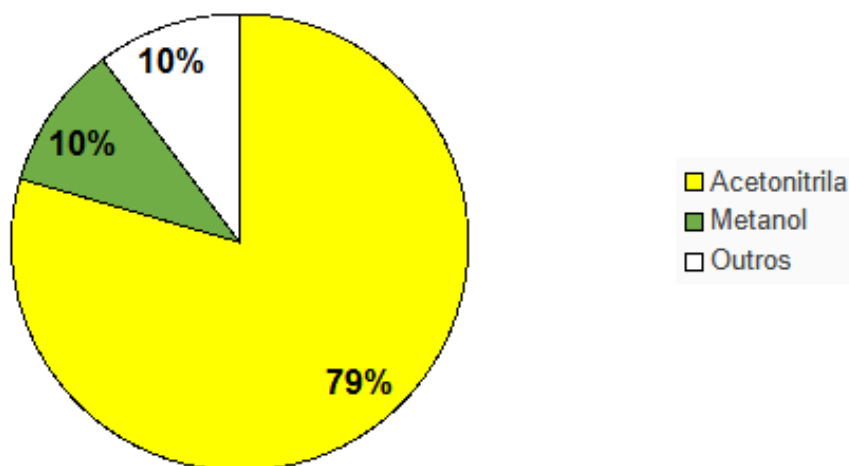


Figura 8- Comparação entre diferentes solventes aplicados em processos de análise por HPLC de curcuminoides do açafrão da terra pela comunidade científica no período de 1992 - 2019.  
Fonte: Autor.

#### **1.4 Solventes Eutéticos Naturais Profundos (NADES), como uma nova tendência para a extração de compostos de interesse de matrizes naturais complexas**

Os solventes eutéticos naturais profundos (NADES) são uma subclasse de um grupo conhecido como misturas de baixa temperatura de transição de fase (*Low Temperature Transition Mixtures*), sendo caracterizados como misturas eutéticas.

Os LTTMs, em geral, compartilham características de interesse para um solvente, como por exemplo, baixa pressão de vapor, estabilidade térmica e não inflamabilidade, apresentando uma menor toxicidade do que solventes tradicionais. O termo eutético, que dá nome a esta classe de solventes, está relacionado a uma mistura de dois ou mais componentes que apresentam um ponto mínimo de fusão em um diagrama de fases, consideravelmente menor aos pontos de fusão das substâncias isoladas (DURAND; LECOMTE; VILLENEUVE, 2016) (Figura 9).

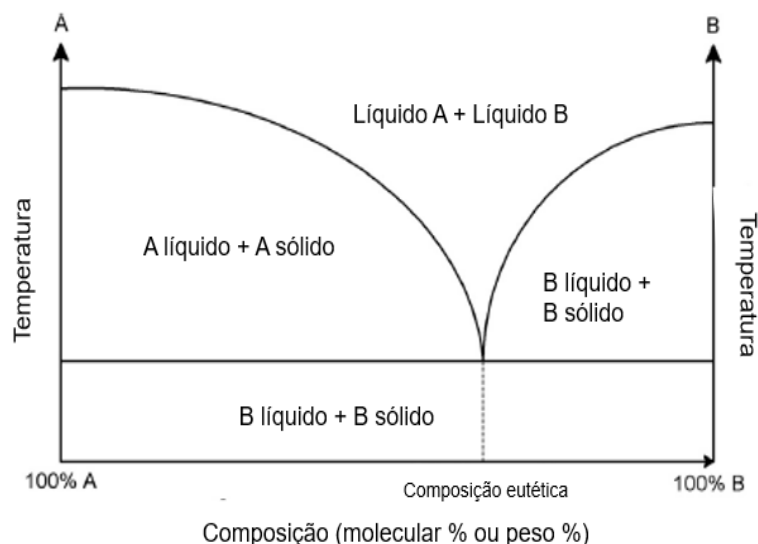


Figura 9- Diagrama de fases de uma mistura de dois compostos com a representação de uma mistura eutética. Adaptado de DURAND; LECOMTE; VILLENEUVE, 2016.

Subdivisões desse grupo de misturas podem ser encontrados ao se agrupar misturas que partilham características em comuns, como líquidos iônicos (IL) e “solventes” (misturas) eutéticos profundos (DES). Entretanto, o uso dos termos que definem as diversas misturas de baixa temperatura de transição pela comunidade científica em geral, por vezes é confusa e a discussão entre as diferenças entre uma subclasse e outra deste grupo, é difusa e vaga (DURAND; LECOMTE; VILLENEUVE, 2016).

A grande, e principal, diferença entre os líquidos iônicos e os solventes eutéticos profundos pode ser encontrada nos constituintes dessas misturas, uma vez que os ILs são formados exclusivamente por espécies iônicas, sendo formados por processos compostos de uma série de etapas. Além de necessitar de processos onerosos, os ILs demandam de alta pureza e qualquer impureza na mistura, pode afetar significativamente as propriedades físicas e químicas, tornando-as de difícil aplicação (FRANCISCO; VAN DEN BRUINHORST; KROON, 2013; PACHECO-FERNÁNDEZ; PINO, 2019; PAIVA *et al.*, 2014).

No entanto, os solventes eutéticos têm ganhado significativo interesse da comunidade científica nos últimos anos como solventes verdes, por estes apresentarem biodegradabilidade e sustentabilidade (DURAND; LECOMTE; VILLENEUVE, 2016; ESPINO et al., 2016; FRANCISCO; VAN DEN BRUINHORST; KROON, 2013).

A formação de um solvente eutético ou mistura eutética é o resultado da combinação entre uma molécula com a capacidade de doar ligações de hidrogênio (HBD), e outra molécula capaz de recebê-las (HBA) (Figura 10).

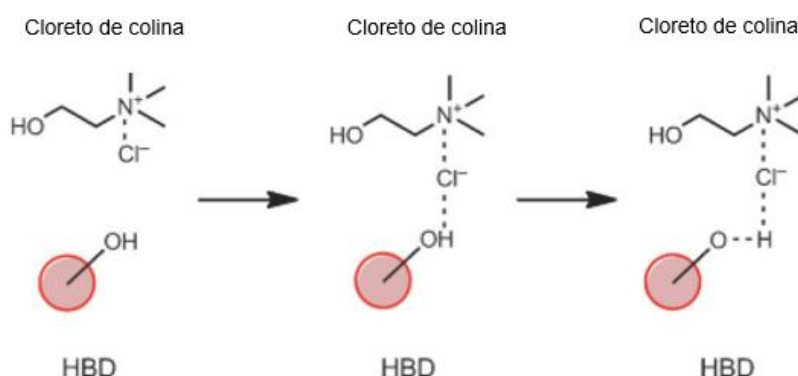


Figura 10- Esquema de formação de um DES através da formação de uma ligação de hidrogênio. Adaptado de FRANCISCO; VAN DER BRUINHORST; KROON, 2013.

A formação da ligação de hidrogênio e interações de Van der Waals entre os compostos é a causa principal do abaixamento do ponto de fusão da mistura, uma vez que a associação dessas moléculas leva a uma deslocalização energética na estrutura cristalina dos sólidos em questão, responsável por um aumento da entropia durante a transição de fase, levando a diminuição considerável no ponto de fusão (CVJETKO BUBALO et al., 2018; FRANCISCO; VAN DEN BRUINHORST; KROON, 2013). A força das ligações de hidrogênio formadas está diretamente relacionada à temperatura. Em geral, uma ligação de hidrogênio mais forte causará um maior decréscimo no ponto de fusão da mistura, uma vez que uma maior estabilização da estrutura formada foi alcançada (CVJETKO BUBALO et al., 2018).

De modo diferente do que foi encontrado com os líquidos iônicos nos últimos anos, o potencial verde dos solventes eutéticos foi comprovado ao se realizar estudos sobre sua biodegradabilidade, onde várias classes de DES foram avaliadas em meios aquosos com oxigênio, levando em 28 dias, a uma biodegradação máxima de 69,3% para DES baseados em aminas e açúcares (ZHAO *et al.*, 2015), indicando que a substituição de solventes orgânicos tradicionais por diferentes classes de misturas eutéticas, representa um avanço dos conceitos da Química Verde e Química Analítica Verde.

Entretanto, os solventes eutéticos, em geral, apresentam uma desvantagem significativa na sua utilização que deve ser ressaltada. De maneira geral, a diminuição do volume total causada pela mudança de estado físico, implica em menores movimentos moleculares e maiores viscosidades, por consequência, tornando sua aplicação mais complexa, mas não impossível (CHOI *et al.*, 2011; CVJETKO BUBALO *et al.*, 2018; DAI *et al.*, 2016; DAI; VAN SPRONSEN; *et al.*, 2013; DAI; WITKAMP; *et al.*, 2013; DURAND; LECOMTE; VILLENEUVE, 2016; FERNÁNDEZ *et al.*, 2018; FRANCISCO; VAN DEN BRUINHORST; KROON, 2013; ZHAO *et al.*, 2015).

A grande viscosidade dos DES difere com sua composição, mas em todos os casos, pode ser amenizada com a adição de certas quantidades de água. Entretanto, doses de água devem ser adicionadas com cuidado à mistura, uma vez que quantidades grandes podem influenciar na ligação de hidrogênio até um ponto onde não exista mais uma mistura eutética entre os componentes de interesse e a água, mas sim a dissolução dos componentes pela quebra da estrutura supramolecular formada pela rede de ligações de hidrogênio (CVJETKO BUBALO *et al.*, 2018; DAI *et al.*, 2016; DAI; VAN SPRONSEN; *et al.*, 2013; DAI; WITKAMP; *et al.*, 2013; FRANCISCO; VAN DEN BRUINHORST; KROON, 2013; ZHAO *et al.*, 2015).

Outra alternativa para auxiliar na diminuição da viscosidade dos DES é a utilização de temperaturas próximas à 40°C e 50°C. Essa faixa de temperatura provoca diminuição significativa da viscosidade, pois em temperatura ambiente ocorre menores vibrações devido a menor energia cinética disponível, enquanto que em temperaturas mais altas, quando energia cinética é

empregada à mistura, ocorre a quebra de barreiras intermoleculares, fazendo com que condições mais amenas viabilizem o livre movimento sem causar dano a estrutura supramolecular da rede de ligações de hidrogênio (CVJETKO BUBALO *et al.*, 2018; DAI *et al.*, 2016; DAI; VAN SPRONSEN; *et al.*, 2013; DAI; WITKAMP; *et al.*, 2013; FRANCISCO; VAN DEN BRUINHORST; KROON, 2013; ZHAO *et al.*, 2015).

Mais recentemente à descoberta dos DES, uma nova classe de DES foi adicionada ao rol de classes de solventes verdes ao se utilizar moléculas naturais na formação da misturas eutéticas. Essas misturas foram classificadas como NADES (*Natural Deep Eutetic Solvents*) e partilha as mesmas características já mencionadas de um solvente eutético, fazendo com que a fronteira que separe os conceitos de DES e NADES encontre-se apenas no tipo de componentes utilizados na formação da mistura (DURAND; LECOMTE; VILLENEUVE, 2016).

A descoberta dos NADES está associada a estudos de defesa e sobrevivência de alguns organismos em situações extremas, como secas intermitentes e condições de frio intenso, levando a processos de revivescência. Foi reportado por Choi *et al.*, 2011 que uma mistura eutética natural pode conter água na estrutura supramolecular da mistura, o que faria com que, nas condições citadas anteriormente, moléculas de água que fazem parte do solvente, fiquem presas em sua forma líquida, impossibilitando sua evaporação ou congelamento. Esse processo indica que plantas que se mostrassem visivelmente mortas, estando secas e quebradiças, ainda apresentavam sinais e características que indicavam sua atividade como um organismo vivo, uma vez que os NADES atuam como provedores de água para sua sobrevivência por certo período. Posteriormente ao período de extrema falta de água, quando os níveis exteriores de água voltaram ao normal, as plantas em questão voltaram a ter sinais normais de atividade (CHOI *et al.*, 2011).

A grande vantagem da utilização de DES e NADES se encontra na possibilidade de desenvolvimento de um solvente específico que contenha características desejadas para cada aplicação. O número de NADES que

podem ser formados é cerca de  $10^6$  combinações (CVJETKO BUBALO *et al.*, 2018; ESPINO *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2015), além de serem de fácil preparo e baixo custo de obtenção dos constituintes isolados (CVJETKO BUBALO *et al.*, 2018; DAI *et al.*, 2016; DAI; VAN SPRONSEN; *et al.*, 2013; DAI; WITKAMP; *et al.*, 2013), pois esses constituintes podem ser encontrados facilmente na natureza, como açúcares e ácidos orgânicos.

Os métodos mais comuns para o preparo dessas misturas baseiam-se em aquecimento e agitação em placas magnéticas, técnicas de banho-maria, e métodos de evaporação usando um rotaevaporador, sendo consideradas técnicas simples, empregando cerca de 45 a 90 minutos de preparo (DAI; WITKAMP; *et al.*, 2013; ESPINO *et al.*, 2016).

Outra subclasse de solventes eutéticos que vem ganhando destaque é dos Solventes Eutéticos Naturais Profundos Hidrofóbicos (*Hydrophobic Natural Deep Eutectic Solvents*, hNADES), cujas misturas são formadas exclusivamente por compostos naturais hidrofóbicos.

No início do desenvolvimento de solventes Eutéticos naturais, a pesquisa restringiu-se ao estudo de misturas formadas por compostos hidrofílicos, uma vez que a utilização de compostos de caráter hidrofóbico para a formação destas misturas, foi reportada pela primeira vez, apenas em 2015, onde foram utilizados para a extração de ácidos graxos e biomoléculas de um ambiente aquático (RIBEIRO *et al.*, 2015.)

Outras aplicações de sucesso de solventes eutéticos naturais hidrofóbicos encontraram sucesso, mostrando seu potencial como solvente para microextrações, e para extrações de componentes de folhas (ARAIN, *et al.*, 2016; CAO, CHEN *et al.*, 2019; CAO, JUN *et al.*, 2017; DE FARIA *et al.*, 2017).

A maioria dos hNADES pode ser preparada sob condições amenas de temperatura e agitação, gastando menos tempo e energia em relação a preparação dos NADES tradicionais. Essa subclasse de solventes eutéticos possui as mesmas características dos NADES, porém com seletividade

compatível com a maioria dos solventes hidrofóbicos usados em processos de extrações tradicionais que possuem conhecida toxicidade (DWAMENA, 2019; VAN OSCH *et al.*, 2015, 2019).

### **1.5 Extração Assistida por Microondas (*Microwave-assisted extraction*, MAE)**

De modo geral, as estratégias mais comuns de extração de compostos de suas matrizes exigem grandes quantidades de solventes (que podem ser tóxicos ao meio ambiente e ao analista) para obter maior eficiência em uma miríade de métodos que vão da simples agitação de mistura à extração das amostras por horas em sistemas de refluxo (ZHAN *et al.*, 2011).

Uma alternativa às técnicas tradicionais de extração é a Extração Assistida por Micro-ondas (MAE). A MAE proporciona maior eficiência na extração em menor tempo, utilizando radiação micro-ondas em que é possível controlar a temperatura e programar gradientes de temperatura como precisão através da potência aplicada. (GÓMEZ *et al.*, 2018; LI; NGADI; MA, 2014; WAKTE *et al.*, 2011). Além de extrações, a MAE é uma técnica rápida e eficiente para o preparo dos NADES.

O consumo energético da MAE chega a ser 650 vezes menor do que o consumo das técnicas de agitação para preparo dos NADES, sendo uma técnica que está de acordo com os princípios da química analítica verde (GOMEZ *et al.*, 2018; GÓMEZ *et al.*, 2018). Além disso, devido a precisão nos parâmetros como potência, temperatura e tempo, a MAE permite otimizações que potencializam a eficiência da técnica para um determinado fim.

## **2. OBJETIVO**

O objetivo do trabalho foi utilizar abordagens verdes, sustentáveis e eficientes para extração quantitativa de curcuminoides do açafrão da terra (*Curcuma longa* L.), aplicando estratégias verdes para a análise destes compostos.

### **2.1 Estratégias lógicas para se alcançar os objetivos propostos**

A primeira etapa desenvolvida neste projeto, foi o desenvolvimento de uma revisão bibliográfica, citada anteriormente, onde as estratégias mais utilizadas pela comunidade científica para a extração e análise de curcuminoides do açafrão da terra foi identificada. A partir destes resultados, foi desenvolvido um método cromatográfico verde para a análise destes compostos por HPLC-PAD/UV-Vis, onde foi avaliada a eficiência desta técnica ao se utilizar bioetanol e água como fase móvel em uma abordagem multiparamétrica e multivariada. Os resultados desta etapa foram avaliados estatisticamente, e indicaram as melhores condições para a análise destes compostos.

Em seguida, foi desenvolvido o método de extração de curcuminoides por MAE, utilizando planejamento experimental, e estes extratos foram avaliados por HPLC nas melhores condições encontradas na etapa anterior.

Para fins de comparação, foram realizadas extrações com solventes tradicionais, como etanol e metanol para a extração de curcuminoides.

### 3. MATERIAIS E METODOLOGIAS

#### 3.1 Materiais utilizados

Bioetanol (EtOH, food grade, Agro Industrial Tarumã Ltda, Brasil), Etanol (EtOH, HPLC grade, LiChrosolv, Merck KGaA, Alemanha), H<sub>2</sub>O ultrapurificada em sistema Milli-Q (Millipore, USA), ácido acético (grau analítico, Synth, Brasil), glicerol  $\geq 99,5\%$  (GLY, Sigma Aldrich, Estados Unidos da América), d-glicose  $\geq 99,5\%$  (GLU, Sigma Aldrich, Estados Unidos da América), sacarose  $\geq 99,5\%$  (SAC, Sigma Aldrich, Estados Unidos da América), ácido láctico  $\geq 85\%$  (LA, Sigma Aldrich, Estados Unidos da América), d-sorbitol  $\geq 98\%$  (SOR, Sigma Aldrich, Estados Unidos da América), d-ácido málico  $\geq 98\%$  (MA, Sigma Aldrich, Estados Unidos da América), cloreto de colina  $\geq 98\%$  (CC, Sigma Aldrich, Estados Unidos da América), d-frutose  $\geq 99\%$  (FRU, Sigma Aldrich, Estados Unidos da América), l-prolina  $\geq 99\%$  (PRO, Sigma Aldrich, Estados Unidos da América), 1-tetradecanol  $\geq 97\%$  (1TD, Sigma Aldrich, Estados Unidos da América), ácido decanoico  $\geq 98\%$  (DEC, Sigma Aldrich, Estados Unidos da América), l-mentol  $\geq 99\%$  (MEN, Sigma Aldrich, Estados Unidos da América), timol  $\geq 99\%$  (THY, Sigma Aldrich, Estados Unidos da América), ácido oleico  $\geq 99\%$  (OLE, Sigma Aldrich, Estados Unidos da América) e ácido cítrico  $\geq 99\%$  (CA, Sigma Aldrich, Estados Unidos da América) foram usados nesta parte do trabalho.

O pó da raiz de *C. longa* foi adquirido comercialmente em supermercados da região de Bauru, no estado de São Paulo, Brasil, tendo sua utilização aprovada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, com cadastro n° A0A1927.

#### 3.2 Instrumentação utilizada

Análises por HPLC-PAD foram realizadas em um equipamento Jasco® (Japan) equipado com um injetor automático AS-2055, forno CO-2060, detector MD-2015 e bomba com 4 canais PU-2089s. Três colunas cromatográficas foram utilizadas nos momentos iniciais do desenvolvimento do método verde de

análise em diferentes planejamentos fatoriais fracionários, sendo elas: Luna(2) Phenomenex C<sub>18</sub> (5µm 250x4,6mm), XBridge Waters RP (5µm 150x4,6mm) e XSelect Waters CSH fenil-hexil (5µm 150x4,6mm) sendo amparadas por uma pré-coluna Safety Guard Phenomenex C<sub>18</sub> (5µm 7x2mm). O volume de injeção utilizado para todas as análises foi de 20 µL e as análises foram monitoradas em  $\lambda = 250 \text{ nm}$  e  $\lambda = 425 \text{ nm}$ . O software utilizado foi o ChromNAV© [Build 3] (Jasco). Cada coluna cromatográfica foi equilibrada com 5x seu volume morto.

Análises de UHPLC-MS foram realizadas em um equipamento Shimadzu® (Nexera UC, Kyoto, Japan), compost por um controlador CBM 20-A, um degasser DGU-20A, uma bomba quaternária Nexera X2 LC-30AD, um auto-injetor Nexera X2 SIL-30AC), um compartimento para coluna termoe estável CTO-20AC, e um espectrômetro de massas quadrupolo em interface ESI LC2020. O método HPLC-PAD foi transposto para UHPLC-MS com a ajuda de um software gratuito chamado HPLC calculator versão 3.0 (GUILLARME; HEINISCH; ROCCA, 2004). A separação foi obtida em uma coluna C<sub>18</sub>, de dimensões 150 x 2.10 mm, 1.7 µm (Kinetex, Phenomenex®, USA). Os componentes da fase móvel foram água e etanol HPLC grade, no seguinte gradiente: 47.4-100% B em 30 min. A vazão do sistema foi de 0,2 mL.min<sup>-1</sup>, a temperatura do forno do sistema foi mantida em 35° e o volume de injeção foi de 1 µL. A coluna foi equilibrada com 5 ml da fase móvel inicial. Os espectros de massas foram obtidos nos modos de ionização positivo e negativo. As condições do espectrômetro de massas foram: vazão do gás nebulizador, 1,5 L.min<sup>-1</sup>; vazão do gás secante, 15 L.min<sup>-1</sup>; A voltagem do detector foi de 0,1 kV. O espectrômetro de massas foi operado na faixa de 100 a 1000 m/z (full-scan).

### **3.3 Preparo das amostras**

Para o desenvolvimento do método cromatográfico por HPLC-PAD foi realizada a extração por maceração dinâmica em que 0,5g do pó da amostra foi embebido em 10 ml de uma mistura hidroalcolica, utilizando etanol de cereais 95°GL (EtOH), numa proporção de EtOH:H<sub>2</sub>O 7:3 (v/v), sob agitação de 250rpm em um agitador magnético (Heidolph, Alemanha), durante uma hora a

temperatura ambiente. A solução foi centrifugada em uma microcentrífuga (BioPet Technologies, global trade, Brasil) por 3 minutos a 7200 rpm. O sobrenadante foi filtrado em microfiltro de PTPE 0,45µm (Simple Pure – Allcrom, Brasil) para posterior análise por HPLC.

### **3.4 Cálculos estatísticos**

Cálculos de efeitos de parâmetros, bem como gráficos de probabilidade e elaboração de tabelas ANOVA para cada planejamento foram realizados nos softwares GNU Octave 4.2.1 (John W. Eaton) e LibreOffice Calc v. 6.4.6.2 (The Document Foundation, USA). As superfícies de resposta foram plotadas no software Statistica 7 (StatSoft®, USA).

### **3.5 Desenvolvimento do método cromatográfico verde a partir de uma abordagem multiparamétrica e multivariada**

No desenvolvimento do método cromatográfico para análise dos curcuminoides de *C. longa* foi utilizada uma abordagem multiparamétrica e multivariada, utilizando-se um planejamento experimental, iniciando pela triagem dos parâmetros com a realização de planejamento fatorial fracionário de cinco variáveis e dois níveis ( $2\sqrt{5-1}$ ).

No planejamento fatorial fracionário foram utilizados valores codificados, ou níveis, variando de níveis baixos (-1) e níveis altos (1) e um ponto central (0) com réplicas (Tabela 3). Foi realizado um planejamento fatorial fracionário diferente para cada uma das três colunas cromatográficas estudadas. A partir dos resultados obtidos através do planejamento fatorial fracionário da melhor coluna cromatográfica encontrada, um modelo de ajuste fino foi desenvolvido através de um planejamento Doehlert com as 3 variáveis da etapa de triagem que mostraram significância para a resposta estudada, num nível de confiança de 95% (Tabela 4), em busca das melhores condições de extração dos compostos de interesse.

Tabela 2- Variáveis e níveis estudados no planejamento experimental fracionário para o desenvolvimento do método de análise verde de curcuminoides de *C. longa* por HPLC-PAD

| Variáveis   | Luna C18 |       |      | XBridge RP |      |      | XSelect fenil-hexil |      |      |
|-------------|----------|-------|------|------------|------|------|---------------------|------|------|
|             | -1       | 0     | 1    | -1         | 0    | 1    | -1                  | 0    | 1    |
| X1 (%)      | 21,05    | 31,58 | 42,1 | 19,7       | 29,7 | 39,7 | 22,9                | 32,9 | 42,9 |
| X2 (%)      | 84,21    | 94,74 | 100  | 71,8       | 81,8 | 91,8 | 62,3                | 72,3 | 82,3 |
| X3 (°C)     | 35       | 47,5  | 60   | 35         | 57,5 | 80   | 35                  | 57,5 | 80   |
| X4 (%)      | 0        | 0,5   | 1    | 0          | 0,5  | 1    | 0                   | 0,5  | 1    |
| X5 (ml/min) | 0,6      | 0,8   | 1    | 0,6        | 0,8  | 1    | 0,6                 | 0,8  | 1    |

Tabela 3- Planejamento fatorial fracionário 2v<sup>5-1</sup>

| Experimento/<br>Variável | X1                     | X2                   | X3            | X4            | X5                  |
|--------------------------|------------------------|----------------------|---------------|---------------|---------------------|
|                          | (% Inicial<br>de EtOH) | (% Final de<br>EtOH) | (Temperatura) | (% de<br>HAc) | Vazão do<br>sistema |
| 1                        | -1                     | -1                   | -1            | -1            | 1                   |
| 2                        | 1                      | -1                   | -1            | -1            | -1                  |
| 3                        | -1                     | 1                    | -1            | -1            | -1                  |
| 4                        | 1                      | 1                    | -1            | -1            | 1                   |
| 5                        | -1                     | -1                   | 1             | -1            | -1                  |
| 6                        | 1                      | -1                   | 1             | -1            | 1                   |
| 7                        | -1                     | 1                    | 1             | -1            | 1                   |
| 8                        | 1                      | 1                    | 1             | -1            | -1                  |
| 9                        | -1                     | -1                   | -1            | 1             | -1                  |
| 10                       | 1                      | -1                   | -1            | 1             | 1                   |
| 11                       | -1                     | 1                    | -1            | 1             | 1                   |
| 12                       | 1                      | 1                    | -1            | 1             | -1                  |
| 13                       | -1                     | -1                   | 1             | 1             | 1                   |
| 14                       | 1                      | -1                   | 1             | 1             | -1                  |
| 15                       | -1                     | 1                    | 1             | 1             | -1                  |
| 16                       | 1                      | 1                    | 1             | 1             | 1                   |
| CP1*                     | 0                      | 0                    | 0             | 0             | 0                   |
| CP2*                     | 0                      | 0                    | 0             | 0             | 0                   |
| CP3*                     | 0                      | 0                    | 0             | 0             | 0                   |
| CP4*                     | 0                      | 0                    | 0             | 0             | 0                   |
| CP5*                     | 0                      | 0                    | 0             | 0             | 0                   |

Tabela 4- Planejamento Doehlert de 3 variáveis

| Experimento | % inicial de EtOH | Temperatura | Vazão  |
|-------------|-------------------|-------------|--------|
| DO1 (CP1)*  | 0                 | 0           | 0      |
| DO2 (CP2)*  | 0                 | 0           | 0      |
| DO3 (CP3)*  | 0                 | 0           | 0      |
| DO4         | 1                 | 0           | 0      |
| DO5         | 0,5               | 0           | 0,866  |
| DO6         | 0,5               | 0,817       | 0,289  |
| DO7         | -1                | 0           | 0      |
| DO8         | -0,5              | 0           | -0,866 |
| DO9         | -0,5              | -0,817      | -0,289 |
| DO10        | 0,5               | 0           | -0,866 |
| DO11        | 0,5               | -0,817      | -0,289 |
| DO12        | -0,5              | 0           | 0,866  |
| DO13        | 0                 | -0,817      | 0,577  |
| DO14        | -0,5              | 0,817       | 0,289  |
| DO15        | 0                 | 0,817       | -0,577 |

\* Experimentos de Ponto Central

A resposta utilizada nos planejamentos do desenvolvimento do método cromatográfico foi a *Green Chromatographic Fingerprinting* (GCF, Eq. 1) (SOUZA *et al*, 2021). Essa métrica é uma adaptação da métrica *Green Chromatographic Fingerprinting Response* (GCFR) desenvolvida por Funari *et al*. 2014 para a elaboração de fingerprinting de matrizes complexas.

$$GCF = n^* \left( \frac{FP}{MP} \right) * \left( \frac{n}{t} \right) \text{ (Eq. 1)}$$

Onde n é o número total de picos de um determinado cromatograma, t é o tempo de retenção do último composto de interesse, FP é a seção do cromatograma com um número menor de picos, e MP é a seção do cromatograma que tem o maior número de picos (SOUZA *et al*, 2021; FUNARI, *et al*. 2014).

### 3.6 Preparação das misturas eutéticas NADES e hNADES

O preparo das misturas eutéticas foi realizada em proporções fixas entre os componentes (Tabela 5) de acordo com trabalhos que relatam que essas proporções formam misturas eutéticas utilizadas em extrações de compostos fenólicos. Os NADES (misturas #1 à #9) e hNADES (misturas #10 à #14) foram preparados em vials de borossilicato de 4 cm (5 mL). Em cada vial foram adicionados os componentes nas proporções molares informadas na Tabela 3. Os vials foram devidamente fechados, colocados em um tubo de teflon (24,5cm x 5cm) e levados ao micro-ondas. Para a preparação das misturas foi programada uma potência de 500W e temperaturas de 50°C para os NADES e 30°C para os hNADES. As misturas permaneceram no micro-ondas até a formação de líquido.

Tabela 5- NADES e hNADES preparados

| Mistura   | Componente 1      | Componente 2 | Componente 3 | Razão molar | t (min) | Obs.                | Referência                                            |
|-----------|-------------------|--------------|--------------|-------------|---------|---------------------|-------------------------------------------------------|
| NADES#1   | Ácido málico      | Sorbitol     | -            | 1:1*        | 10      | Incolor             | (GOMEZ <i>et al.</i> , 2018)                          |
| NADES#2   | Ácido málico      | Glicose      | Frutose      | 1:1:1*      | 30      | Amarelado           | (DAI <i>et al.</i> , 2016)                            |
| NADES#3   | Ácido láctico     | Sacarose     | -            | 2:1*        | 10      | Incolor             | (RUESGAS-RAMÓN; FIGUEROA-ESPIÑOZA; DURAND, 2017)      |
| NADES#4   | Ácido láctico     | Glicose      | -            | 1:2*        | 5       | Levemente amarelado | (DAI <i>et al.</i> , 2016)                            |
| NADES#5   | Cloreto de colina | Sorbitol     | -            | 1:2*        | 10      | Incolor             | (NAM <i>et al.</i> , 2015)                            |
| NADES#6   | Cloreto de colina | Glicose      | -            | 1:1*        | 15      | Levemente amarelado | (DAI <i>et al.</i> , 2016; DUAN <i>et al.</i> , 2016) |
| NADES#7   | Prolina           | Ácido málico | -            | 1:1*        | 20      | Incolor             | (DUAN <i>et al.</i> , 2016)                           |
| NADES#8   | Cloreto de colina | Glicerol     | -            | 1:2*        | 10      | Incolor             | (DUAN <i>et al.</i> , 2016)                           |
| NADES#9   | Ácido láctico     | Glicerol     | -            | 1:1*        | 10      | Incolor             | (DUAN <i>et al.</i> , 2016)                           |
| hNADES#10 | Ácido oleico      | Mentol       | -            | 1:1         | 5       | Incolor             | (TERESHATOV; BOLTOEVA; FOLDEN, 2016)                  |
| hNADES#11 | 1-                | Mentol       | -            | 1:2         | 5       | Incolor             | (VAN OSCH <i>et al.</i> , 2019)                       |

|           |                 |        |   |     |   |                      |                                 |
|-----------|-----------------|--------|---|-----|---|----------------------|---------------------------------|
|           | tetradecanol    |        |   |     |   |                      |                                 |
| hNADES#12 | Ácido decanoico | Mentol | - | 1:2 | 5 | Amarelado            | (VAN OSCH <i>et al.</i> , 2019) |
| hNADES#13 | Timol           | Mentol | - | 1:1 | 5 | Levemente alaranjado | (VAN OSCH <i>et al.</i> , 2019) |
| hNADES#14 | Timol           | Mentol | - | 1:2 | 5 | Levemente alaranjado | (VAN OSCH <i>et al.</i> , 2019) |

---

\* Adicionado 20% em massa de água

### 3.7 Processo de extração em micro-ondas (MAE)

Todas as misturas eutéticas (NADES e hNADES) estudadas foram utilizadas para extrações de curcuminoides de *C. longa* assistidas por micro-ondas em triplicatas. Para cada 500 mg de mistura eutética foi adicionado 50mg de pó da raiz de *Curcuma longa* L. em vial de borossilicato (4 cm d.i., 5 mL) e introduzido em tubos de Teflon (24,5cm x 5cm) do sistema de digestão. Todas as extrações foram realizadas sob irradiação micro-ondas por 7 minutos, a 30°C e 100W. Após a extração, as misturas foram diluídas em 500 mg de EtOH, colocadas em um microtubo de 1,5 mL (Eppendorf, Olen, Brasil) e centrifugada em microcentrifuga (Biopet Technologies, Brasil) por 3 minutos em 7200 rpm. Após a centrifugação, 500 µL de sobrenadante foram coletados, filtrados em microfiltro de 0,45 µm PTFE (Phenomenex, USA) e injetados no sistema CLAE nas condições descritas na seção 4.2.

### 3.8 Planejamento de composto central (CCD) com hNADES #13 por MAE

Um planejamento de composto central com 4 variáveis (Tabela 6) foi utilizado para otimizar a condição ótima da extração com a mistura eutética #13 (TI:MEN 1:1) por MAE.

Tabela 6- Planejamento experimental de composto central com 4 variáveis para otimização da extração por MAE utilizando hNADES#13

| Experimento | Proporção<br>planta/solvente<br>(X1) |               | Potência (X2) |             | Temperatura (X3) |              | Tempo (X4) |               |
|-------------|--------------------------------------|---------------|---------------|-------------|------------------|--------------|------------|---------------|
|             | Codificado                           | Real<br>(m/m) | Codificado    | Real<br>(W) | Codificado       | Real<br>(°C) | Codificado | Real<br>(min) |
| 1           | -1                                   | 0,3           | -1            | 300         | -1               | 40           | -1         | 22,5          |
| 2           | 1                                    | 0,8           | -1            | 300         | -1               | 40           | -1         | 22,5          |
| 3           | -1                                   | 0,3           | 1             | 700         | -1               | 40           | -1         | 22,5          |
| 4           | 1                                    | 0,8           | 1             | 700         | -1               | 40           | -1         | 22,5          |
| 5           | -1                                   | 0,3           | -1            | 300         | 1                | 60           | -1         | 22,5          |
| 6           | 1                                    | 0,8           | -1            | 300         | 1                | 60           | -1         | 22,5          |
| 7           | -1                                   | 0,3           | 1             | 700         | 1                | 60           | -1         | 22,5          |
| 8           | 1                                    | 0,8           | 1             | 700         | 1                | 60           | -1         | 22,5          |
| 9           | -1                                   | 0,3           | -1            | 300         | -1               | 40           | 1          | 47,5          |
| 10          | 1                                    | 0,8           | -1            | 300         | -1               | 40           | 1          | 47,5          |
| 11          | -1                                   | 0,3           | 1             | 700         | -1               | 40           | 1          | 47,5          |
| 12          | 1                                    | 0,8           | 1             | 700         | -1               | 40           | 1          | 47,5          |
| 13          | -1                                   | 0,3           | -1            | 300         | 1                | 60           | 1          | 47,5          |
| 14          | 1                                    | 0,8           | -1            | 300         | 1                | 60           | 1          | 47,5          |
| 15          | -1                                   | 0,3           | 1             | 700         | 1                | 60           | 1          | 47,5          |
| 16          | 1                                    | 0,8           | 1             | 700         | 1                | 60           | 1          | 47,5          |
| 17 (CP1)*   | 0                                    | 0,6           | 0             | 500         | 0                | 50           | 0          | 35            |
| 18 (CP2)*   | 0                                    | 0,6           | 0             | 500         | 0                | 50           | 0          | 35            |
| 19 (CP3)*   | 0                                    | 0,6           | 0             | 500         | 0                | 50           | 0          | 35            |
| 20 (CP4)*   | 0                                    | 0,6           | 0             | 500         | 0                | 50           | 0          | 35            |
| 21 (CP5)*   | 0                                    | 0,6           | 0             | 500         | 0                | 50           | 0          | 35            |
| 22          | -2                                   | 0,1           | 0             | 500         | 0                | 50           | 0          | 35            |
| 23          | 2                                    | 1             | 0             | 500         | 0                | 50           | 0          | 35            |
| 24          | 0                                    | 0,6           | -2            | 100         | 0                | 50           | 0          | 35            |
| 25          | 0                                    | 0,6           | 2             | 900         | 0                | 50           | 0          | 35            |
| 26          | 0                                    | 0,6           | 0             | 500         | -2               | 30           | 0          | 35            |
| 27          | 0                                    | 0,6           | 0             | 500         | 2                | 70           | 0          | 35            |
| 28          | 0                                    | 0,6           | 0             | 500         | 0                | 50           | -2         | 10            |
| 29          | 0                                    | 0,6           | 0             | 500         | 0                | 50           | 2          | 60            |

\* Experimentos de Ponto Central

A resposta utilizada neste estudo foi a soma das áreas das bandas cromatográficas referentes aos curcuminoides encontrados no leito cromatográfico nas análises por HPLC-PAD a  $\lambda = 250$  nm.

### **3.9 Reprodução (adaptada) de métodos da literatura de extração de curcuminoides de *Curcuma longa* L.**

Para a comparação do método de extração otimizado, foram escolhidos 3 trabalhos que utilizam NADES (CA:GLU, 1:1, mol/mol)] (LIU et al., 2019), solução hidroalcoólica (MeOH:H<sub>2</sub>O, 8:2, v/v) (BENER et al., 2016) e EtOH (LI; NGADI; MA, 2014). Na extração com NADES (LIU et al., 2019), 50 mg de amostra foi imergida em uma mistura de 5g de NADES (CA:GLU) sob agitação contante por 1 h em um agitador magnético MR Hei-Tech (Heidolph, Alemanha) a 50°C. Uma quantidade de 0.7 mg da mistura foi diluída em 0.3 mg de solução EtOH:H<sub>2</sub>O (7:3,m/m), colocada em um microtubo (Eppendorf, Olen, Brasil) e centrifugada em microcentrifuga (Biopet Technologies, Brasil) por 10 minutos e 9000 rpm. O sobrenadante (1 mL) foi filtrado em microfiltro de PTFE (Phenomenex, USA) e injetado no sistema CLAE nas condições descritas na seção 4.2.

Na extração com EtOH (LI; NGADI; MA, 2014), uma proporção de 1:200 (amostra:EtOH, m/m) foi colocada em vial de borossilicato de 4 cm (5 mL) com metade do volume preenchido. O vial, devidamente fechado, foi colocado dentro de um tubo de teflon (24,5cm x 5cm) e levado ao micro-ondas digestor durante 7 minutos, a 25°C e 80W. Após a irradiação, a mistura foi centrifugada em microcentrifuga (Biopet Technologies, Brasil) por 3 minutos e 7200 rpm. Uma quantidade de 0.7 mg do sobrenadante foi diluída em 0.3 mg de solução EtOH:H<sub>2</sub>O (7:3,m/m), filtrada em microfiltro de 0,45  $\mu$ m de PTFE (Phenomenex, USA) e injetada no sistema CLAE nas condições descritas na seção 5.6.

Na extração com solução hidroalcoólica (MeOH:H<sub>2</sub>O, 8:2) (BENER et al., 2016), uma mistura de 0,1 g de amostra com 20 g de solução hidroalcoólica foi colocado em um vial e em um tubo de teflon (com as mesmas medidas já citadas), e levada ao sistema de digestão por micro-ondas por 5 minutos em

1500 W. Após a irradiação, a mistura também foi centrifugada em microcentrifuga (Biopet Technologies, Brasil) por 3 minutos e 7200 rpm. Uma quantidade de 0.7 mg do sobrenadante foi diluído em 0.3 mg de etanol, filtrado em microfiltro de 0.45  $\mu\text{m}$  PTFE (Phenomenex, USA) e injetado no sistema CLAE nas condições descritas na seção 4.2.

### **3.10 Análises térmicas e caracterização espectroscópica da mistura eutética**

A obtenção das curvas de DSC (Differential Scanning Calorimetry) foi realizada utilizando-se uma quantidade 2-5 mg de amostra, colocada em um cadinho com tampa perfurada, sendo submetido a um completo aquecimento e resfriamento, de  $-90^{\circ}\text{C}$  a  $30^{\circ}\text{C}$ . As análises foram realizadas em um fluxo de aquecimento de  $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ .

Os espectros infravermelhos foram obtidos em um espectrofotômetro FTIR Bruker Vertex 70. As análises das misturas eutéticas, bem como de seus precursores, foram processadas considerando o intervalo espectral de  $675\text{ cm}^{-1}$  até  $4000\text{ cm}^{-1}$ , com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  e 32 scans por espectro.

### **3.11 Coerência dos métodos desenvolvidos com os princípios da Química Analítica Verde**

A coerência dos métodos de análise e de extração desenvolvidos neste trabalho, com cada um dos 12 princípios da Química Analítica Verde foi avaliada de acordo com a métrica AGREE (*Analytical GREENess*), que estipula uma escala de 0 a 1 como resultado final para os métodos desenvolvidos e replicados da literatura, sendo o resultado 1 (representado pela coloração verde escura) àquele mais coerente com os princípios estipulados, e o resultado 0, àquele com menos coerência (PENA-PEREIRA et al, 2020).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Determinação dos principais parâmetros cromatográficos por Planejamento Fatorial Fracionário $2_v^{5-1}$

O planejamento fatorial fracionário foi realizado com o intuito de determinar as variáveis cromatográficas de maior interferência na separação dos compostos de *C. longa* por HPLC, utilizando água e bioetanol como fase móvel. Os valores das variáveis foram definidos de maneira diferentes entre as colunas cromatográficas estudadas, uma vez que cada coluna possui suas limitações em relação a quantidade de água, ácido e temperatura, conforme apresentado na Tabela 2.

A resposta utilizada para avaliar as variáveis foi uma função desejabilidade da resposta GCF (Equação 1) e a resolução média das bandas cromatográficas dos curcuminoides encontrados (Tabela 7).

Tabela 7- Resultados de GCF, Resolução Média e desejabilidade dos planejamentos fatoriais fracionários para cada coluna cromatográfica estudada

| Coluna /<br>Resposta | Luna C18 |           |      | XBridge C18 |           |      | XSelect fenil-hexil |           |      |
|----------------------|----------|-----------|------|-------------|-----------|------|---------------------|-----------|------|
|                      | GCF**    | Resolução | D*   | GCF**       | Resolução | D*   | GCF**               | Resolução | D*   |
| TR 1                 | 3,0661   | 9,00      | 0,06 | 0,7156      | 10,71     | 0,00 | 0,7204              | 9,41      | 0,23 |
| TR 2                 | 12,0966  | 15,48     | 0,17 | 7,3345      | 2,99      | 0,17 | 0,6644              | 5,43      | 0,16 |
| TR 3                 | 0,0000   | 15,49     | 0,00 | 1,4709      | 6,37      | 0,14 | 0,7309              | 7,68      | 0,21 |
| TR 4                 | 84,6681  | 64,75     | 0,98 | 3,0968      | 3,29      | 0,12 | 4,0637              | 3,15      | 0,26 |
| TR 5                 | 3,0995   | 1,33      | 0,00 | 1,0946      | 2,78      | 0,03 | 3,6096              | 7,40      | 0,45 |
| TR 6                 | 79,4595  | 20,43     | 0,52 | 10,5934     | 2,47      | 0,12 | 0,8133              | 2,11      | 0,08 |
| TR 7                 | 5,9280   | 15,69     | 0,12 | 3,7749      | 6,18      | 0,27 | 1,4302              | 7,25      | 0,28 |
| TR 8                 | 45,3337  | 7,43      | 0,22 | 23,1267     | 2,93      | 0,30 | 4,6815              | 2,93      | 0,27 |
| TR 9                 | 12,2785  | 13,27     | 0,16 | 0,7271      | 8,28      | 0,00 | 0,0000              | 11,71     | 0,00 |
| TR 10                | 60,1951  | 68,01     | 0,84 | 2,4142      | 3,26      | 0,10 | 0,4817              | 1,28      | 0,00 |
| TR 11                | 14,3276  | 59,07     | 0,38 | 0,8510      | 3,88      | 0,04 | 0,0000              | 4,75      | 0,00 |
| TR 12                | 76,6088  | 14,25     | 0,42 | 10,4066     | 2,24      | 0,00 | 4,3339              | 3,55      | 0,30 |
| TR 13                | 11,8736  | 59,78     | 0,35 | 1,6397      | 3,27      | 0,08 | 1,1322              | 6,70      | 0,24 |
| TR 14                | 37,1207  | 1,93      | 0,06 | 20,5375     | 2,31      | 0,09 | 10,4584             | 1,70      | 0,20 |

|        |         |       |      |        |      |      |        |      |      |
|--------|---------|-------|------|--------|------|------|--------|------|------|
| TR 15  | 21,9993 | 3,78  | 0,10 | 8,1393 | 3,61 | 0,25 | 4,3217 | 5,51 | 0,41 |
| TR 16  | 60,7595 | 2,82  | 0,13 | 5,5524 | 3,28 | 0,17 | 6,4499 | 2,14 | 0,23 |
| CP1*** | 13,5439 | 15,23 | 0,18 | 1,2416 | 2,57 | 0,03 | 8,1051 | 4,60 | 0,50 |
| CP2*** | 13,5439 | 15,22 | 0,18 | 4,0835 | 2,48 | 0,07 | 8,1021 | 4,60 | 0,50 |
| CP3*** | 13,5378 | 15,00 | 0,18 | 4,3028 | 2,49 | 0,07 | 8,4112 | 4,57 | 0,50 |
| CP4*** | 11,7179 | 15,19 | 0,17 | 9,7185 | 2,46 | 0,11 | 8,4112 | 4,61 | 0,51 |
| CP5*** | 13,5439 | 15,19 | 0,18 | 9,7185 | 2,44 | 0,10 | 8,6262 | 4,62 | 0,51 |

---

\* Desejabilidade encontrada entre GCF e Resolução Média de Curcuminoides

\*\* Green Chromatographic Fingerprinting

\*\*\* Experimentos de Ponto Central

Baseado na análise dos resultados de desejabilidade obtidas para os três planejamentos fatoriais fracionários realizados, foi possível se perceber que a coluna cromatográfica Luna C<sub>18</sub> se mostrou a mais eficiente para a separação dos compostos de interesse das três colunas cromatográficas estudadas, mostrando, em média, melhores valores de GCF, Resolução Média, e por consequência, de desejabilidade global, utilizando bioetanol e água como fase móvel.

Dentre os demais experimentos deste planejamento fatorial fracionário, observa-se que os resultados estão de acordo com o princípio da função de desejabilidade, onde o experimento TR10, que apresenta a maior Resolução Média de curcuminoides encontrados, teve, como resposta final, uma desejabilidade inferior à alcançada pelo experimento TR4, uma vez que seu respectivo GCF, foi menor.

Portanto, dentre os experimentos realizados para a coluna Luna C18, o experimento TR4 foi o que apresentou a melhor separação dos dois grupos principais presentes na amostra com boa resolução cromatográfica, em um tempo menor de análise (Figura 11), cujas condições cromatográficas foram: % inicial de EtOH = 42,1%, %final de EtOH = 100%, Temperatura = 35 °C % de HAc = 0% e Vazão do sistema = 1 ml/minuto. Deve-se destacar também, o grande número de bandas cromatográficas separadas neste experimento, fato que contribuiu positivamente para a resposta, uma vez que se utilizou o peso

máximo para picos encontrados nos cromatogramas obtidos, segundo a equação do GCF (Equação 1).

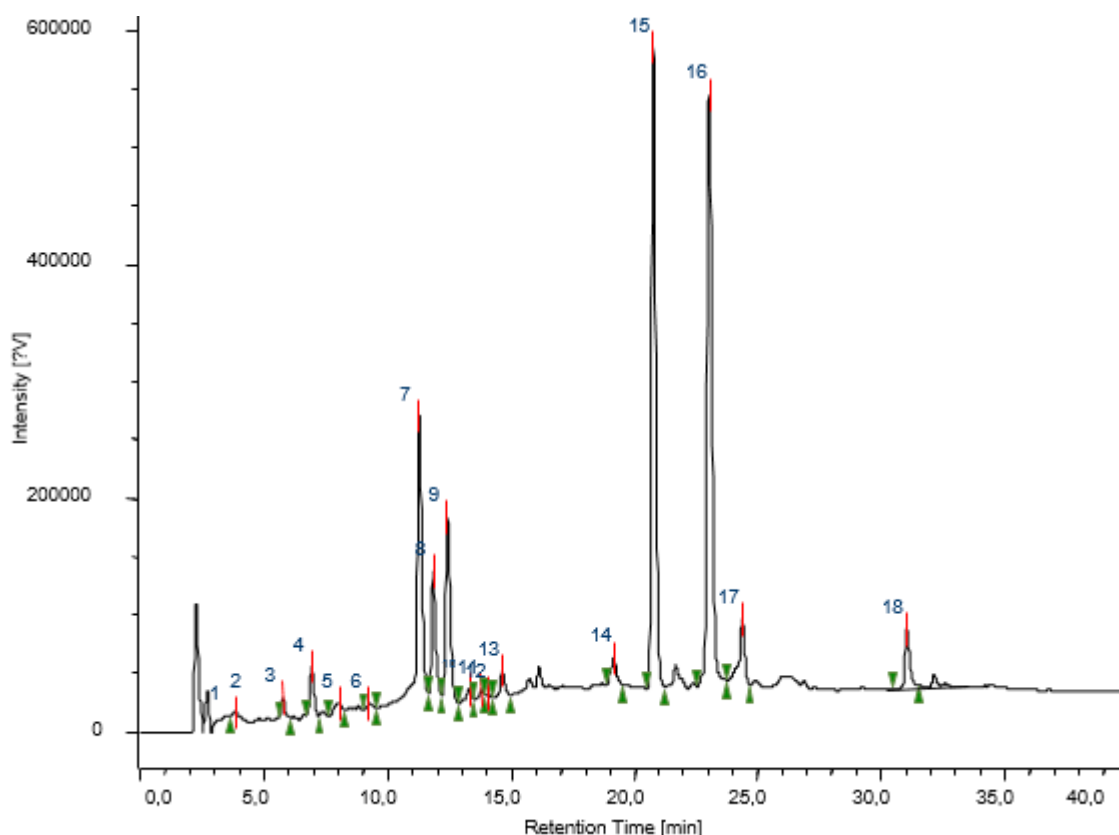


Figura 11- Cromatograma do Experimento TR4, com melhor desejabilidade global. 42,1-100% de EtOH em 35°C, com 0% de ácido acético, em 1 ml.min<sup>-1</sup>. Cromatograma obtido em 250nm.

Para a determinação das principais parâmetros cromatográficos (variáveis) com 95% de confiança, foi plotado o Gráfico de probabilidade de contrastes (Fig. 12a) e porcentagem de contrastes (Fig. 12b).

Pela análise dos gráficos foi possível identificar que os contrastes C1, C3 e C5, pertencentes as variáveis X1 (% inicial de EtOH), X3 (Temperatura) e X5 (Vazão), apresentaram maior importância na separação dos constituintes. Estes contrastes podem ser identificados como aqueles que estão além da faixa do t crítico, calculado pelo teste t de Student (linha laranja na Figura 12a). Além das variáveis citadas, a interação entre a variável X1 e X3 também apresentou significância em um estudo com 95% de confiança (Figura 12b).

É importante ressaltar que somente o Gráfico Normal de Probabilidade (Figura 12a) não é suficiente para se definir a significância ou não de um parâmetro estudado, pois o gráfico de probabilidade pode apresentar significância para um certo contraste, porém esse contraste possui uma porcentagem pequena de efeito e assim poderia ser considerado desprezível para a resposta. Desta maneira, a análise da figura 8b se faz necessária, pois é possível avaliar a porcentagem de cada contraste, indicando a contribuição com que cada variável afeta a resposta estudada. Com isso, é possível observar que os contrastes C5, C1 e C3, respectivamente, são os que contribuem mais para a resposta estudada, contabilizando entre interações de primeira e de segunda ordem, 70,44% de contribuição na resposta.

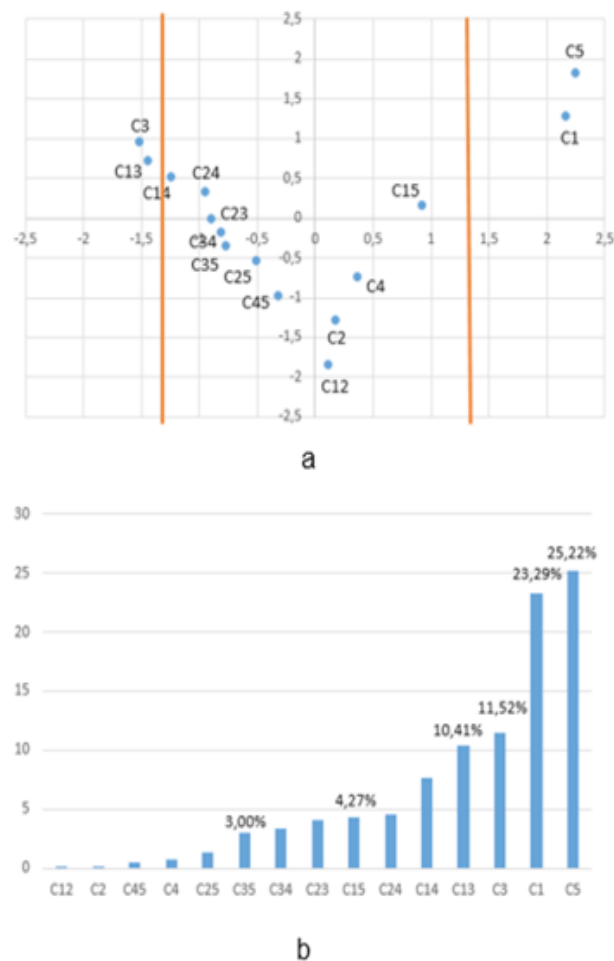


Figura 12 - Gráficos normais de a) probabilidade de contrastes b) porcentagem de contrastes

## **4.2 Ajuste das variáveis mais importantes (Planejamento Doehlert) e calculo do modelo matemático para o método cromatográfico verde do sistema HPLC**

A determinação das variáveis que afetam significativamente a resposta estudada leva a elaboração de um novo planejamento experimental em busca de um resultado ótimo de separação dos compostos de interesse. Como 3 variáveis foram determinadas como significantes nos cálculos estatísticos realizados, tendo estas, diferentes contribuições na resposta (Figura 12a e 12b), optou-se pelo desenvolvimento de um planejamento Doehlert, pois esse planejamento possui um número menor de experimentos necessários para três fatores de significância quando comparado a outros planejamentos experimentais de ajuste fino, bem como diferentes níveis de estudo para cada parâmetro.

Como o planejamento de Doehlert possui diferentes quantidades de níveis para as diferentes variáveis, foi atribuído maior número de níveis de acordo com o maior valor de contraste. Portanto, para variável X1 foram atribuídos 5 níveis, para X3 foram atribuídos 3 níveis e para X5, que afeta mais significativamente a resposta estudada, foram atribuídos 7 níveis.

Os valores reais dos diferentes níveis estudados neste planejamento foram calculados por relações matemáticas ao se estabelecer o ponto central dessa série de experimentos (Tabela 8) como as melhores condições da etapa anterior de desenvolvimento (planejamento fatorial fracionário). As demais variáveis que não apresentaram significância foram estabelecidas como constantes nas melhores condições encontradas no experimento TR4. Para a X2 (% final de etanol) foi atribuído o valor de 100% e X4 (% de ácido acético na fase móvel) 0%.

Através da análise dos resultados obtidos nesta parte do desenvolvimento do método verde (Tabela 8), foi possível observar que a % inicial de EtOH (X1) nas análises aparenta ter um comportamento quadrático, uma vez que porcentagens medianas de etanol apresentaram uma maior

desejabilidade, enquanto os extremos positivos e negativos não obtiveram grandes resultados de desejabilidade, bem como a temperatura (X3). No entanto, a vazão do sistema (X5), aparenta ter um comportamento linear, uma vez que maiores valores de vazão no sistema apresentam resultados melhores de desejabilidade, sugerindo um modelo matemático descrito por estas características. Com os valores de desejabilidade obtidos pelo planejamento Doehlert de cálculos de regressão foram empregados e estão apresentados na tabela ANOVA (Tabela 9) para determinar um modelo matemático do sistema para determinar um ponto ótimo com as melhores condições para separação e resolução das bandas cromatográficas do fingerprinting de *C. Longa*.

Tabela 8- Planejamento Doehlert de 3 variáveis com valores codificados e reais

|              | % inicial de EtOH |          | Temperatura |           | Vazão do sistema |                              | Respostas |           |      |
|--------------|-------------------|----------|-------------|-----------|------------------|------------------------------|-----------|-----------|------|
|              | (X1)              |          | (X3)        |           | (X5)             |                              |           |           |      |
| Experimento  | Codificado        | Real (%) | Codificado  | Real (°C) | Codificado       | Real (mL.min <sup>-1</sup> ) | GCF*      | Res. Méd. | D**  |
| DO1 (CP1)*** | 0                 | 42,1     | 0           | 35        | 0                | 1                            | 100,10    | 34,59     | 0,32 |
| DO2 (CP2)*** | 0                 | 42,1     | 0           | 35        | 0                | 1                            | 180,50    | 32,27     | 0,46 |
| DO3 (CP3)*** | 0                 | 42,1     | 0           | 35        | 0                | 1                            | 169,15    | 32,99     | 0,45 |
| DO4          | 1                 | 52,6     | 0           | 35        | 0                | 1                            | 91,36     | 14,48     | 0,06 |
| DO5          | 0,5               | 47,4     | 0           | 35        | 0,866            | 1,17                         | 179,42    | 87,71     | 0,91 |
| DO6          | 0,5               | 47,4     | 0,817       | 45        | 0,289            | 1,05                         | 154,51    | 17,82     | 0,19 |
| DO7          | -1                | 31,6     | 0           | 35        | 0                | 1                            | 37,68     | 31,35     | 0,00 |
| DO8          | -0,5              | 36,8     | 0           | 35        | -0,866           | 0,83                         | 48,27     | 33,19     | 0,13 |
| DO9          | -0,5              | 36,8     | -0,817      | 25        | -0,289           | 0,94                         | 98,95     | 28,61     | 0,27 |
| DO10         | 0,5               | 47,4     | 0           | 35        | -0,866           | 0,83                         | 155,64    | 14,66     | 0,11 |
| DO11         | 0,5               | 47,4     | -0,817      | 25        | -0,289           | 0,94                         | 145,19    | 26,84     | 0,33 |
| DO12         | -0,5              | 36,8     | 0           | 35        | 0,866            | 1,17                         | 149,32    | 32,53     | 0,41 |
| DO13         | 0                 | 42,1     | -0,817      | 25        | 0,577            | 1,11                         | 193,70    | 29,61     | 0,44 |
| DO14         | -0,5              | 36,8     | 0,817       | 45        | 0,289            | 1,05                         | 192,69    | 13,72     | 0,00 |
| DO15         | 0                 | 42,1     | 0,817       | 45        | -0,577           | 0,88                         | 208,33    | 16,35     | 0,19 |

\*Green Chromatographic Fingerprinting

\*\* Desejabilidade encontrada entre GCF e Resolução Média de Curcuminoides

\*\*\*Experimentos de Ponto Central

Tabela 9- Análise de variância por ANOVA para o modelo cromatográfico verde de análise de curcuminoides de *Curcuma longa* L.

| ANOVA                         | Somos Quadráticas | Graus de Liberdade | Médias Quadráticas | Testes F  |          |
|-------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-----------|----------|
|                               |                   |                    |                    | Calculado | Tabelado |
| Regressão                     | 0,54397           | 7                  | 0,07771            | 1,8605    | 6,1532   |
| Resíduos                      | 0,16707           | 4                  | 0,04177            |           |          |
| Total                         | 0,71105           | 11                 |                    |           |          |
| Erro Puro                     | 0,01179           | 2                  | 0,0059             | 13,17083  | 18,8264  |
| Falta de ajuste               | 0,15528           | 2                  | 0,07764            |           |          |
| Variação explicada (%)        |                   | 76,50              |                    |           |          |
| Máxima variação explicada (%) |                   | 98,34              |                    |           |          |

Porém, o teste F1 (entre razões entre médias quadráticas da regressão e dos resíduos), apresentou valor inferior à média dos resíduos, indicando uma contribuição menor da regressão do que dos resíduos entre os valores preditos pelo modelo e os valores reais. Além disso, o teste F2 (médias quadráticas da falta de ajuste e do erro puro), apresentou valor inferior à média quadrática da falta de ajuste, indicando pouca significância estatística.

A falta de ajuste de um modelo está relacionada à falta de similaridade dos valores preditos pelo modelo em relação aos valores reais obtidos durante os experimentos, de uma forma, onde se é possível descartar a contribuição do erro aleatório das análises (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Entretanto, mesmo com a falta de ajuste detectada, o planejamento de Doehlert indicou condições de alta desejabilidade, com valores altos de GCF e de Resolução das bandas cromatográficas (Experimento DO5, Tabela 8) podendo ser usado como o melhor resultado empírico para a separação dos compostos de *C. longa* por HPLC, utilizando bioetanol e água (Figura 13). Nesse experimento as condições atribuídas foram: X1 = 47,4% de EtOH, X2 = 100% de EtOH, X3 = 35°C, X4 = 0% de HAc, X5 = 1,17 ml.min<sup>-1</sup>

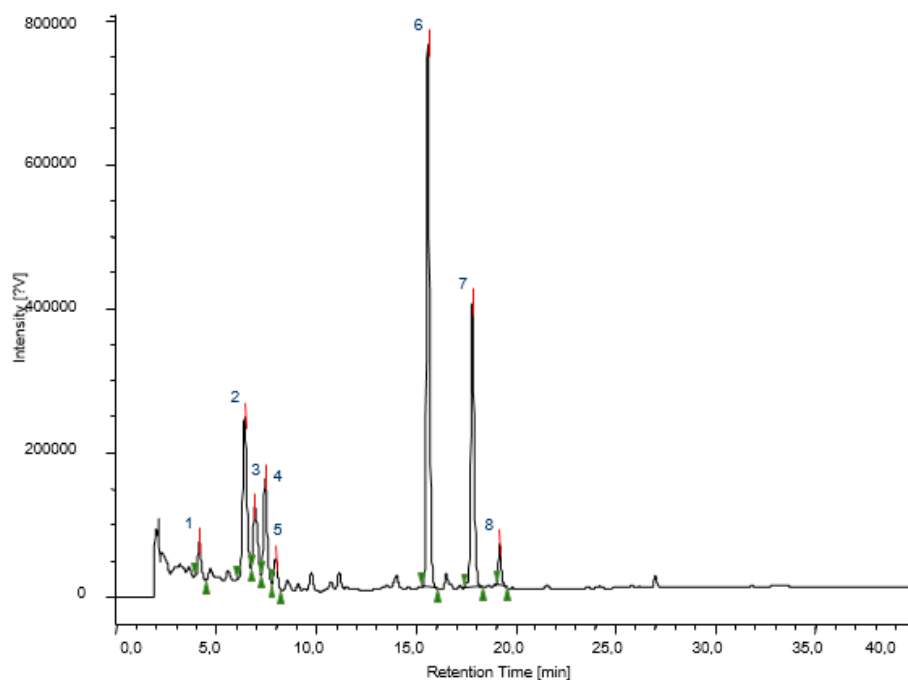


Figura 13- Cromatograma com maior desejabilidade para o planejamento Doehlert, 42,1-100% de EtOH em 35°C, com 0% de ácido acético, em 1 ml.min<sup>-1</sup>. Cromatograma obtido em 250nm.

### 4.3 Testes de repetitividade do melhor resultado empírico

Para atestar a reprodutibilidade do melhor resultado empírico encontrado (DO5) foram realizadas análises em triplicatas (Tabela 10).

Tabela 10- Experimentos de reprodutibilidade da melhor condição cromatográfica determinada para o método verde desenvolvido para análises de extratos de *C. longa* por HPLC

| Experimento | GCF*   | Resolução média das bandas cromatográficas |
|-------------|--------|--------------------------------------------|
| DO5         | 179,42 | 87,71                                      |
| RP1         | 170,3  | 80,19                                      |
| RP2         | 172,6  | 78,22                                      |
| RP3         | 177,4  | 78,98                                      |

\*Green Chromatographic Fingerprinting

Os erros relativos de cada resposta estudada foram calculados pela seguinte equação:

$$Erro\ relativo\ (\%) = \frac{x - y}{y} * 100\ (Eq.\ 2)$$

Onde x equivale a média das respostas obtidas nos experimentos de repetitividade e y equivale ao valor obtido como a melhor resposta do modelo empírico. Os erros relativos para cada resposta observada foram de 3,34% (GCF) e 9,78% (Resolução), indicando que o método desenvolvido apresenta uma boa reprodutibilidade, pois os erros foram menores do que 10% (ICH, 2015).

#### **4.4 Identificação dos compostos de interesse por LC-PAD-MS e HPLC-PAD**

Após o desenvolvimento do método verde foi realizada a identificação dos constituintes por LC-MS para nortear o desenvolvimento do método de extração verde dos curcuminoides de *C. longa*. Para a identificação dos curcuminoides foram analisados os espectros UV e espectros de massas e comparados com dados da literatura (HE *et al.*, 1998; JADHAV; MAHADIK; PARADKAR, 2007; REVATHY *et al.*, 2011; HE *et al.*, 1998; MONDAL; GHOSH; MOULIK, 2016). Com isso, foi possível identificar os curcuminoides e seus respectivos tempos de retenção no *fingerprinting* obtido pelo método verde desenvolvido (Tabela 11 e Figura 14).

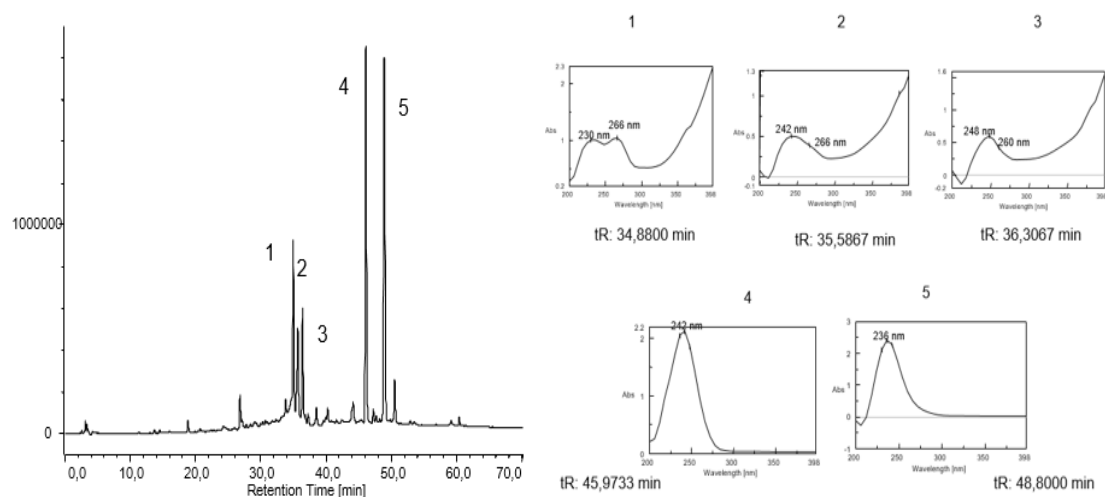


Figura 14: Cromatograma obtido por HPLC-PAD e espectros UV encontrados para o grupo de curcuminoides

Tabela 11- Curcuminoides identificados do extrato hidroalcoólico de *C. longa* por LC-PAD-MS

| Banda | t <sub>R</sub> (min) | UV (nm)  | [M+H] <sup>+</sup> | [M-H] <sup>-</sup> | [M+Na] <sup>+</sup> | [M+K] <sup>+</sup> | Composto | Referência                                  |
|-------|----------------------|----------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|----------|---------------------------------------------|
| 1     | 6,49                 | 263, 434 | 369                | 367                | 391                 | -                  | CUR      | MONDAL; GHOSH; MOULIK, 2016;HE et al, 1998. |
| 2     | 7,23                 | 242, 428 | 339                | 337                | 351                 | 377                | DMC      | MONDAL; GHOSH; MOULIK, 2016;HE et al, 1998. |
| 3     | 7,89                 | 248, 422 | 309                | 307                | 331                 | 347                | bDMC     | MONDAL; GHOSH; MOULIK, 2016;HE et al, 1998. |

#### 4.5 Triagem dos NADES para extrações dos curcuminoides por MAE

Quatorze misturas eutéticas (NADES e hNADES) (Tabela 4) com diferentes polaridades, viscosidades, composições e capacidades de solubilização foram preparadas neste estudo com a finalidade de se avaliar a extração de curcuminoides do açafrão da terra. Entretanto, apenas treze destas

foram selecionadas para testar a eficiência de extração, pois após submetidas ao teste de estabilidade em que ficaram em repouso em um dessecador por um período de 1 mês, onde se foi avaliado se a mistura final era estável no estado líquido ou não, a mistura eutética #4 (Ácido Lático e Glicose 1:2) se solidificou e, portanto, foi descartada para os estudos posteriores.

Dentre as misturas eutéticas hidrofílicas, os NADES baseado em ácido láctico (#3 e #9) foram os que apresentaram maior eficiência na extração dos curcuminoides. Enquanto que a maior eficiência dentre as misturas eutéticas hidrofóbicas foi obtida pelos hNADES baseado em mentol e timol (#13 e #14) (Tabela 12, Figura 15).

Tabela 12- Valores médios de área total de curcuminoides obtidos nas extrações com as misturas eutéticas.

| Mistura   | Composição (mol:mol)                     | Área total de curcuminoides encontrados | DPR (%) |
|-----------|------------------------------------------|-----------------------------------------|---------|
| NADES#1   | Ácido Málico e Sorbitol (1:1)            | $166,32 \cdot 10^5$                     | 5.60    |
| NADES#2   | Ácido Málico e Glicose e Frutose (1:1:1) | $192,45 \cdot 10^5$                     | 5.89    |
| NADES#3   | Ácido Lático e Sacarose (2:1)            | $467,19 \cdot 10^5$                     | 2.79    |
| NADES#5   | Cloreto de Colina e Sorbitol (1:2)       | $123,67 \cdot 10^5$                     | 18.019  |
| NADES#6   | Cloreto de Colina e Glicose (1:1)        | $173,38 \cdot 10^5$                     | 19.54   |
| NADES#7   | Prolina e Àcido Málico (1:1)             | $208,05 \cdot 10^5$                     | 5.91    |
| NADES#8   | Cloreto de Colina e Glicerol (1:1)       | $322,36 \cdot 10^5$                     | 3.75    |
| NADES#9   | Ácido Lático e Glicerol (1:1)            | $394,99 \cdot 10^5$                     | 0.26    |
| hNADES#10 | Ácido Oleico e Mentol (1:1)              | $298,44 \cdot 10^5$                     | 12.47   |
| hNADES#11 | 1-tetradodecanol e Mentol (1:1)          | $298,18 \cdot 10^5$                     | 9.36    |
| hNADES#12 | Ácido Decanoico e Mentol (1:1)           | $256,26 \cdot 10^5$                     | 10.92   |
| hNADES#13 | Timol e Mentol (1:1)                     | $478,16 \cdot 10^5$                     | 4.25    |
| hNADES#14 | Timol e Mentol (1:2)                     | $373,67 \cdot 10^5$                     | 6.72    |

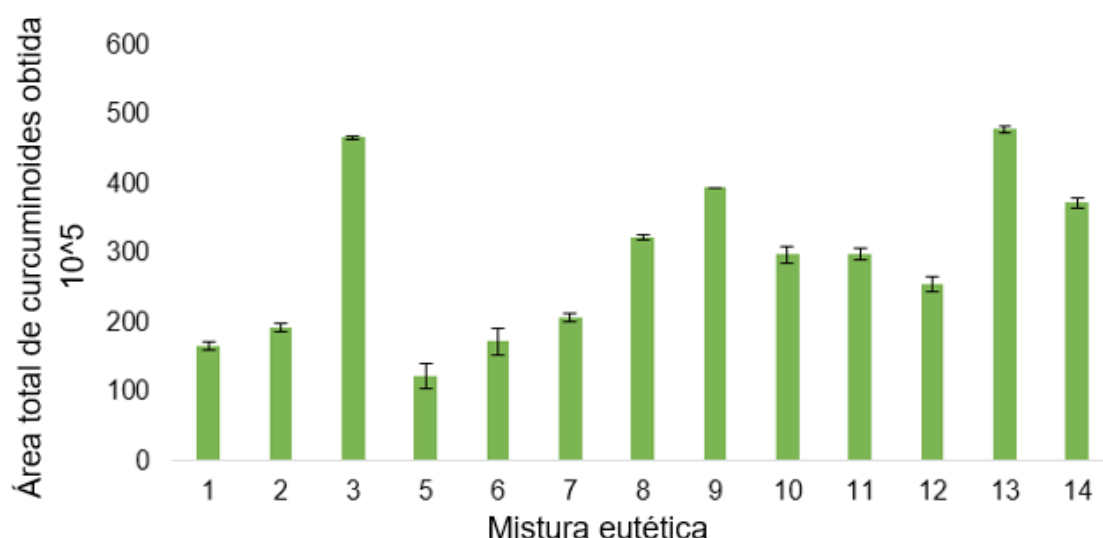


Figura 15- Comparação entre as somas das áreas dos curcuminoides encontrados para cada mistura eutética

Ao se calcular a média relativa entre a eficiência dos NADES ( $\Sigma$ área total/8) e hNADES ( $\Sigma$ área total/5), obtém-se área relativa de  $2.56 \cdot 10^7$  para os NADES e  $3.41 \cdot 10^7$  para os hNADES. Esses valores refletem em uma eficiência 1,33 vezes maior dos hNADES em relação aos NADES.

A principal desvantagem dos NADES quando comparado aos solventes convencionais é sua alta viscosidade inerente. A viscosidade é conhecida por prejudicar a eficiência do NADES como solventes de extração, pois resulta em uma transferência de massa lenta. A viscosidade dos NADES difere enormemente de acordo com sua composição, mas em todos os casos pode ser reduzida pela adição de uma certa quantidade de água (CHOI *et al.*, 2011; DAI; VAN SPRONSEN; *et al.*, 2013). No entanto, a diluição da extensão do NADES ou DES com água (acima de 49%), resultará na perda das ligações de hidrogênio existentes e, conseqüentemente, no desaparecimento da estrutura supramolecular da mistura eutética (DAI *et al.*, 2016; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009). Por esse motivo, foi adicionado apenas 20% de água (em massa) aos NADES avaliados neste estudo (Tabela 10).

Em contrapartida, os hNADES são menos viscosos e, portanto, não necessitam de adição de outros solventes. Outra propriedade importante é que em extrações de matriz vegetal, a hidrofobicidade dos hNADES facilita a permeabilização na membrana celular (CAO, CHEN *et al.*, 2019; CAO, JUN *et al.*, 2017; DE FARIA *et al.*, 2017), o que pode ter proporcionado essa maior eficiência relativa em relação aos NADES. Além disso, no processo de preparação dos hNADES deste trabalho, a temperatura utilizada foi menor do que a temperatura utilizada para a formação dos NADES (seção 2.5), convergindo com os princípios da GAC. Diante dos dados obtidos, o melhor hNADES (mistura eutética #13, formada por Timol e Mentol 1:1 [mol:mol]) foi escolhido para realizar a otimização da extração por planejamento experimental multivariado.

Deve-se ressaltar, no entanto, o grande potencial que a mistura eutética NADES#3 apresenta, apresentando a segunda maior eficiência na extração de compostos de interesse do açafraão da terra, fazendo-o deste, de outra mistura em potencial para o desenvolvimento de um novo método de extração, desta vez, com NADES hidrofílicos.

#### **4.6 Caracterizações térmicas das misturas eutéticas hNADES#13 e hNADES#14**

As análises espectroscópicas e térmicas foram realizadas para confirmar a formação de mistura eutética na composição mentol:timol. Para efeito de comparação, foi realizado o estudo nas proporções 1:1 (#13) e 1:2 (#14) m/m, pois os NADES/hNADES consistem em uma mistura de um aceptor de ligações de hidrogênio (HBA) e um doador de ligações de hidrogênio (HBD) que interagem entre si, promovendo um grande abaixamento do ponto de fusão, quando comparado com os compostos precursores (EL ACHKAR; FOURMENTIN; GREIGE-GERGES, 2019; SANTANA *et al.*, 2019). Porém, esse efeito somente é observado em misturas eutéticas, ou seja, em misturas com proporções definidas entre seus componentes.

As curvas obtidas nas análises de TG-DTA (Figura 16a) apresentam uma única perda de massa entre 90 – 180°C (MENT) e 95 – 190°C (THY), correspondendo ao evento endotérmico em 188°C e 195°C na curva correspondente ao DTA, atribuídas a evaporação dos compostos (CELEBIOGLU; YILDIZ; UYAR, 2018; YILDIZ *et al.*, 2018). Os eventos endotérmicos em 54°C (THY) e 49°C (MENT) na curva DTA, sem perda de massa correspondente na curva do TG, são associadas a fusão dos compostos.

Quanto às curvas de DSC (Figura 16b), quando a mistura THY:MENT (1:1) é resfriada de 30° para -90°C, um pequeno evento exotérmico é observado perto de -11,6°C ( $\Delta H = 1.518 \text{ J g}^{-1}$ ), que pode estar associado a cristalização da amostra. Entretanto, quando a amostra é aquecida, um evento endotérmico é observado próximo de -2,72°C ( $\Delta H = 4.062 \text{ J g}^{-1}$ ), relacionado à fusão. Devido à pequena entalpia relativa desses eventos, é sugerido que apenas parte da amostra sofre cristalização, e consequentemente, fusão. Além disso, é importante ressaltar a mudança presente na linha de base durante o processo de aquecimento, próximo de -59,7°C, associada à transição vítrea da mistura (MORRISON; SUN; NEERVANNAN, 2009). Esse comportamento térmico é similar à mistura de proporção molar 1:2. Para essa mistura, a curva de DSC mostra a cristalização em -10,6°C ( $\Delta H = 2.727 \text{ J g}^{-1}$ ) no resfriamento, e a fusão em -2,57°C ( $\Delta H = 2.989 \text{ J g}^{-1}$ ) e a transição vítrea em -59,3°C durante o aquecimento.

Os pontos de fusão apresentados pelas duas misturas eutéticas confirmam as expectativas das misturas eutéticas profundas, apresentando pontos de fusão significativamente menores em comparação aos seus precursores (Timol: 49°C – 51°C e Mentol: 38°C).

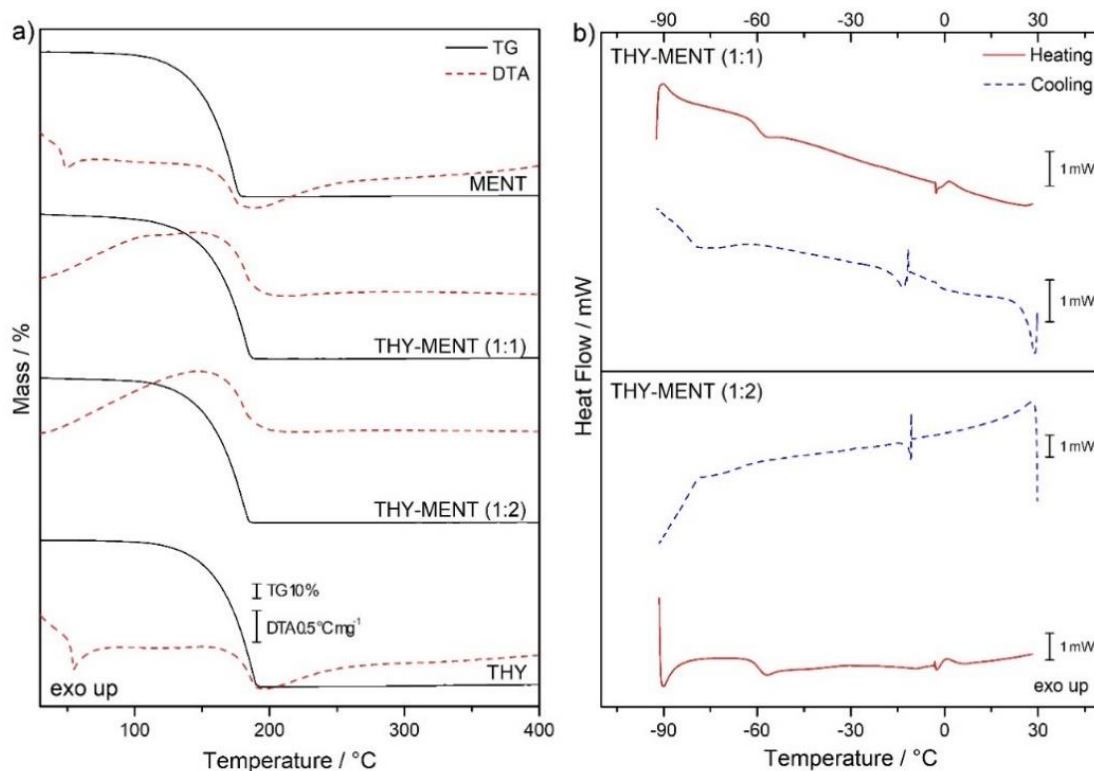


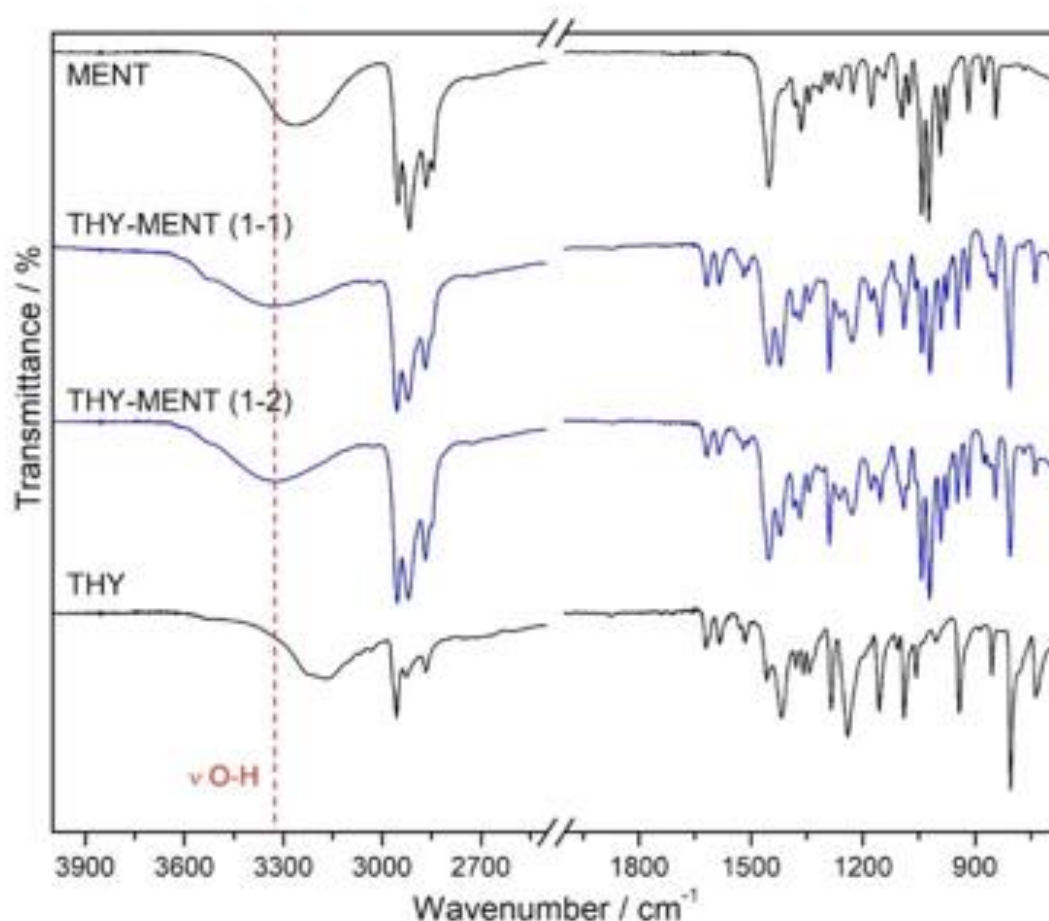
Figura 16- Curvas de a) TG-DTA e b) DSC para as misturas eutéticas hNADES baseadas em timol:mentol e seus precursores.

#### 4.7 Caracterização espectroscópica das misturas eutéticas hNADES#13 e hNADES#14 compostas por Mentol e Timol

As análises dos espectros FTIR (Figura 17) foram focadas nas bandas associadas com as vibrações dos grupos hidroxila, uma vez que esse grupo pode estar envolvido na formação dos hNADES pelo estabelecimento de ligações de hidrogênios entre as espécies. Os espectros FTIR dos precursores estão de acordo com aqueles reportados na literatura (AL-AKAYLEH *et al.*, 2019; CHOONARA *et al.*, 2015; MICHALSKA-SIONKOWSKA; WALCZAK;

SIONKOWSKA, 2017; WU *et al.*, 2021; YILDIZ *et al.*, 2018), em que foi observado que mentol e timol apresentam bandas próximas de  $3232\text{ cm}^{-1}$ , características do grupo hidroxila.

Figura 17- Espectros FTIR das misturas eutéticas baseadas em mentol e timol.



As misturas eutéticas em questão mostram-se muito similares entre si, apresentando combinações dos espectros de seus precursores, com exceção da significativa alargamento e deslocamento hipsocrômico da banda associada com as vibrações  $\nu\text{O-H}$  dos grupos hidroxilas, apresentando um  $\Delta\nu \geq 94\text{ cm}^{-1}$ . Esse resultado confirma que o grupo hidroxila de THY e MENT está envolvido nas interações intermoleculares previstas de uma mistura eutética profunda (DA SILVA *et al.*, 2020; PAVIA *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2015).

#### 4.8 Otimização dos parâmetros de extração dos curcuminoides pelo hNADES#13 por MAE

A mistura #13 (hNADES #13) foi submetida a otimização das condições de extração por MAE utilizando Planejamento do Composto Central (CCD) em que 4 parâmetros foram investigados: Proporção planta/solvente [X1 (massa/massa)]; Potência do micro-ondas [X2 (W)]; Temperatura [X3 (°C)] e Tempo [X4 (min)].

As respostas das análises por CCD (Tabela 13) foram avaliadas em um nível de significância de 95%. Os resultados dos efeitos entre os parâmetros estudados indicaram que, no nível de confiança avaliado, as variáveis Potência (X2) e Temperatura (X3) afetam significativamente as respostas (Figura 18)

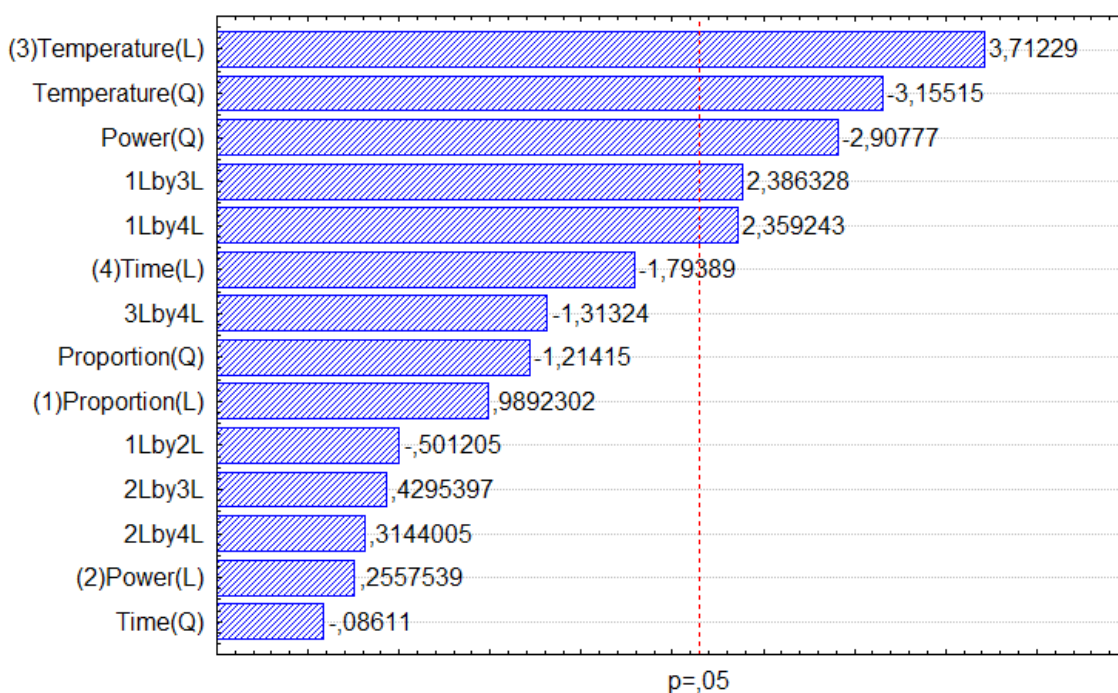


Figura 18- Gráfico de Pareto dos efeitos obtidos como resultado das análises do planejamento de composto central (CCD).

Com isso, os resultados foram analisados por superfície de resposta (RSM) (Figura 19) e para isso, as variáveis não significativas foram fixadas em valores (dentro do domínio experimental) que estão de acordo com os princípios da química verde e GAC, sendo a variável X1 fixada em um valor

que se utiliza menor volume de solvente (razão planta/solvente = 1; codificado X1 = 2) e a variável X4 fixada em um valor que proporciona menor tempo de extração (tempo = 10 min; codificado X4 = -2).

Tabela 13- Área total de curcuminoides obtidos nos experimentos de CCD.

| Experimento | Área Total de Curcuminoides (10 <sup>5</sup> ) | Experimento | Área Total de Curcuminoides (10 <sup>5</sup> ) |
|-------------|------------------------------------------------|-------------|------------------------------------------------|
| CCD1        | 174,83                                         | CCD16       | 482,44                                         |
| CCD2        | 405,11                                         | CCD17 (PC1) | 409,15                                         |
| CCD3        | 160,81                                         | CCD18 (PC2) | 400,09                                         |
| CCD4        | 258,31                                         | CCD19 (PC3) | 395,91                                         |
| CCD5        | 227,38                                         | CCD20 (PC4) | 394,76                                         |
| CCD6        | 523,12                                         | CCD21 (PC5) | 389,01                                         |
| CCD7        | 205,57                                         | CCD22       | 49,516                                         |
| CCD8        | 501,88                                         | CCD23       | 604,62                                         |
| CCD9        | 137,15                                         | CCD24       | 165,66                                         |
| CCD10       | 320,29                                         | CCD25       | 313,74                                         |
| CCD11       | 126,52                                         | CCD26       | 37,12                                          |
| CCD12       | 314,33                                         | CCD27       | 415,92                                         |
| CCD13       | 72,65                                          | CCD28       | 367,23                                         |
| CCD14       | 539,89                                         | CCD29       | 412,84                                         |
| CCD15       | 75,61                                          |             |                                                |

A partir da RSM foi possível determinar o modelo (Eq. 3) para calcular os valores ótimos das variáveis significativas (Tabela 14).

$$A = 92073769.730303 - 5937476,8655303X_2^2 + 8912115,277778X_3 - 6486650,6155303X_3^2 \text{ (Eq.3).}$$

Tabela 14- Condições ótimas determinadas para a extração de curcuminoides de *Curcuma longa* L. por MAE utilizando hNADES#13 como solvente.

| Proporção planta:solvente (m/m; X1) | Potência (X2) | Temperatura (X3) | Tempo (X4) |
|-------------------------------------|---------------|------------------|------------|
| 1:1                                 | 500W          | 63.4°C           | 10 min     |

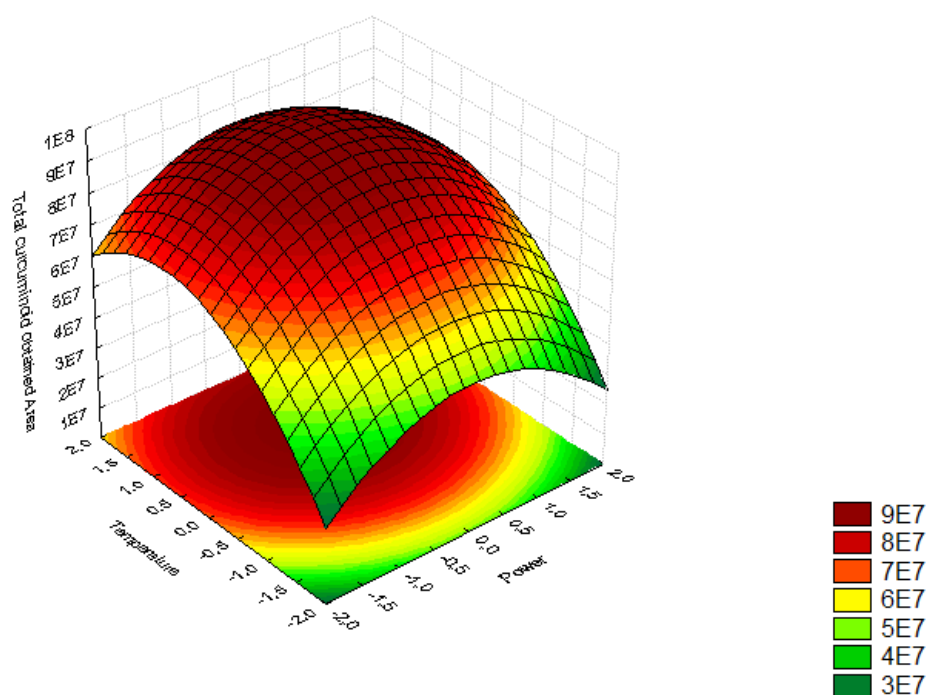


Figura 19- Gráfico de superfície obtido do planejamento de CCD para os parâmetros temperatura e potência.

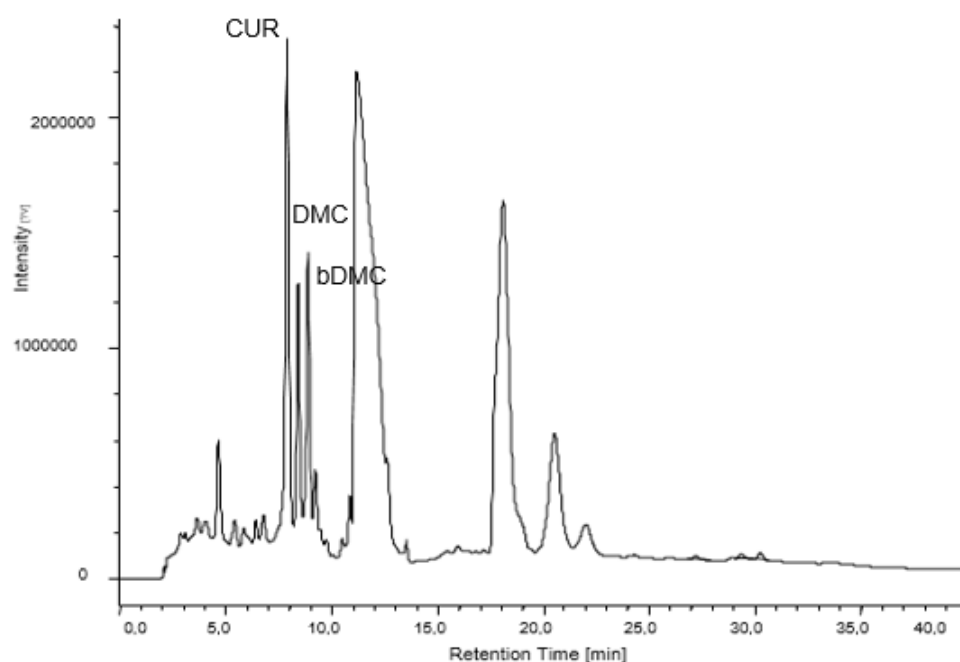


Figura 20- Cromatograma obtido como ponto ótimo do modelo desenvolvido para a extração de curcuminoides de *C. longa* L. 42,1-100% de EtOH em 35°C, com 0% de ácido acético, em 1 ml.min<sup>-1</sup>. Cromatograma obtido em 250nm.

De maneira semelhante à realizada no desenvolvimento do método cromatográfico verde de separação de curcuminoides para HPLC, uma tabela ANOVA foi desenvolvida para se analisar a análise de variância do modelo de

extração proposto com hNADES#13 (Tabela 15). A partir das informações obtidas dos testes F apresentados na tabela ANOVA (Tabela 15), foi possível se detectar falta de ajuste no modelo proposto, uma vez que o teste F2 (entre erro puro e falta de ajuste), indica uma forte significância para a falta de ajuste. A partir do modelo matemático determinado (Eq. 2) foi possível calcular a área total dos curcuminoides prevista para as condições ótimas ( $A_p = 95134942$ ) e comparar com o resultado experimental obtidos ( $A_{exp} = 86741176 \pm 7\%$ ,  $n = 3$ , Figura 20). É possível observar que a diferença entre o valor predito e o experimental foi bem próxima, aproximadamente 9%.

Tabela 15- Análise de variância por ANOVA para o modelo de extração de curcuminoides de *Curcuma longa* L. com hNADES#13.

| ANOVA                         | Somos Quadráticas        | Graus de Liberdade | Médias Quadráticas       | Testes F  |          |
|-------------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|-----------|----------|
|                               |                          |                    |                          | Calculado | Tabelado |
| Regressão                     | $4,73 \cdot 10^{15}$     | 3                  | $4,73 \cdot 10^{15}$     | 37,01     | 2,991    |
| Resíduos                      | $3,204,73 \cdot 10^{15}$ | 25                 | $1,284,73 \cdot 10^{14}$ |           |          |
| Total                         | $7,934,73 \cdot 10^{15}$ | 28                 |                          |           |          |
| Erro Puro                     | $1,804,73 \cdot 10^{15}$ | 24                 | $7,504,73 \cdot 10^{13}$ | 18,63     | 4,26     |
| Falta de ajuste               | $1,404,73 \cdot 10^{15}$ | 1                  | $1,404,73 \cdot 10^{15}$ |           |          |
| Variação explicada (%)        |                          | 59,7               |                          |           |          |
| Máxima variação explicada (%) |                          | 77,3               |                          |           |          |

#### 4.9 Comparação entre os métodos da literatura com o método otimizado para a extração de curcuminoides com hNADES#13

Os métodos da literatura foram reproduzidos com adaptação (seção 3.8) para comparação com o método otimizado para extração com o hNADES #13, cujos cromatogramas estão apresentados na Figura 21, sendo baseados na utilização de solventes tradicionais como Etanol (a) e Metanol (b) por MAE.

Também foi reproduzido o método desenvolvido por LIU et al, 2019 baseado na utilização de NADES formados por ácido cítrico e glicose (1:1) (c).

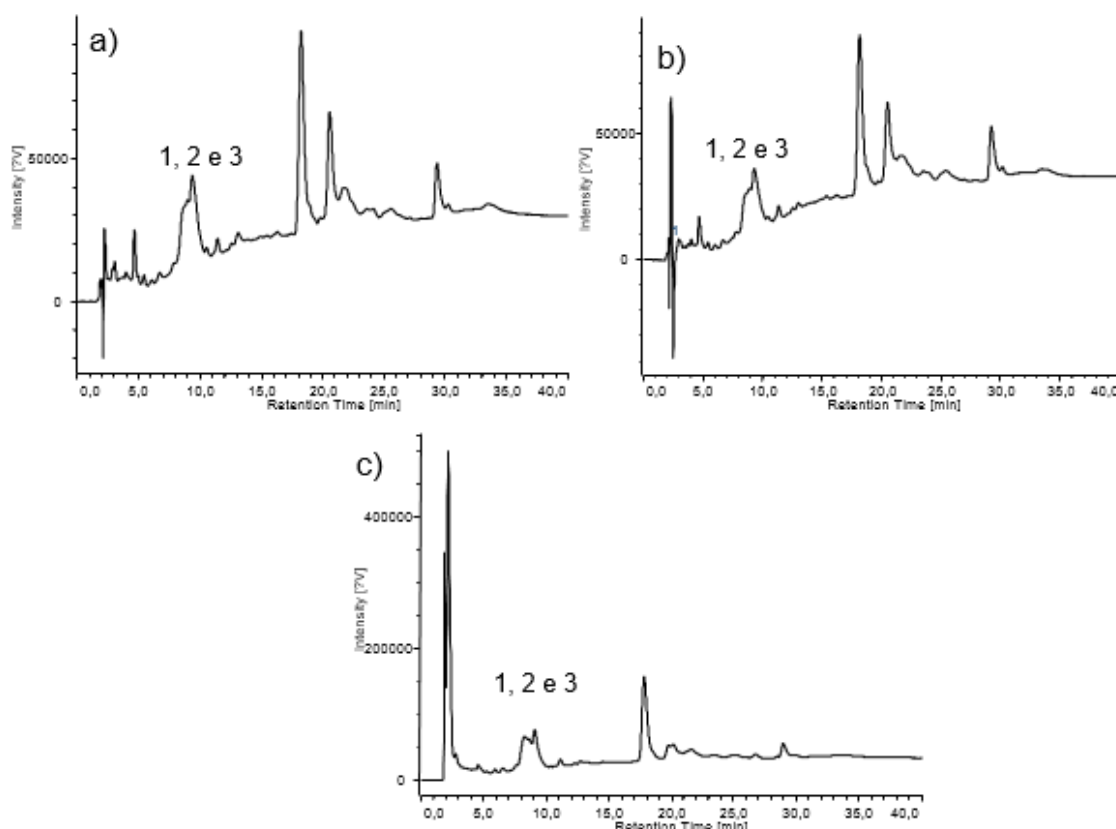


Figura 21- Cromatogramas de extração assistida de micro-ondas (MAE) de curcuminoides de *Curcuma longa* com solventes tradicionais. a) Extração com Etanol b) Extração com Metanol e c) Extração com NADES CA:GLI 1:1 proposto por LIU *et al.* 2019. Todos os cromatogramas foram obtidos a partir de 42,1-100% de EtOH em 35°C, com 0% de ácido acético, em 1 ml.min<sup>-1</sup>, em 250nm.

É possível observar na Tabela 16 e no gráfico da Figura 22 que o método desenvolvido foi mais eficiente do que todos os métodos da literatura reproduzidos, sendo que o método desenvolvido apresentou eficiência, aproximadamente, 43% superior à do método mais eficiente reproduzido. (Com etanol como solvente em MAE) (LI; NGADI; MA 2014).

Destaca-se também, a baixa resolução obtida nos três cromatogramas provindos de extrações com solventes tradicionais, mostrando a vantagem ainda maior da utilização do método desenvolvido para a extração de curcuminoides do açafrão da terra usando o solvente eutético natural profundo hidrofóbico desenvolvido neste estudo.

Tabela 16- Comparação entre os métodos de extração da literatura e o método desenvolvido para a extração de curcuminoides de *C. longa*.

| Método               | Solvente                            | CUR         | DMC        | bDMC       | ΣÁrea**    |
|----------------------|-------------------------------------|-------------|------------|------------|------------|
| LIU et al. (2019)    | CA:GLU<br>(1:1, mol/mol)            | 10199460±10 | *          | 3836581±4  | 14036041±8 |
| BENER et al. (2016)  | MeOH:H <sub>2</sub> O<br>(8:2, v/v) | *           | *          | *          | 28918060±2 |
| LI; NGADI; MA (2014) | EtOH                                | *           | *          | *          | 37146800±7 |
| Método desenvolvido  | THY:MEN<br>(1:1, mol/mol)           | 49110461±14 | 17251272±4 | 20379443±3 | 86741176±7 |

\* Não foi possível calcular a área dos compostos isolados devido à baixa resolução e separação dos compostos encontradas nestas análises.

\*\* Valores expressos em área±%DPR. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

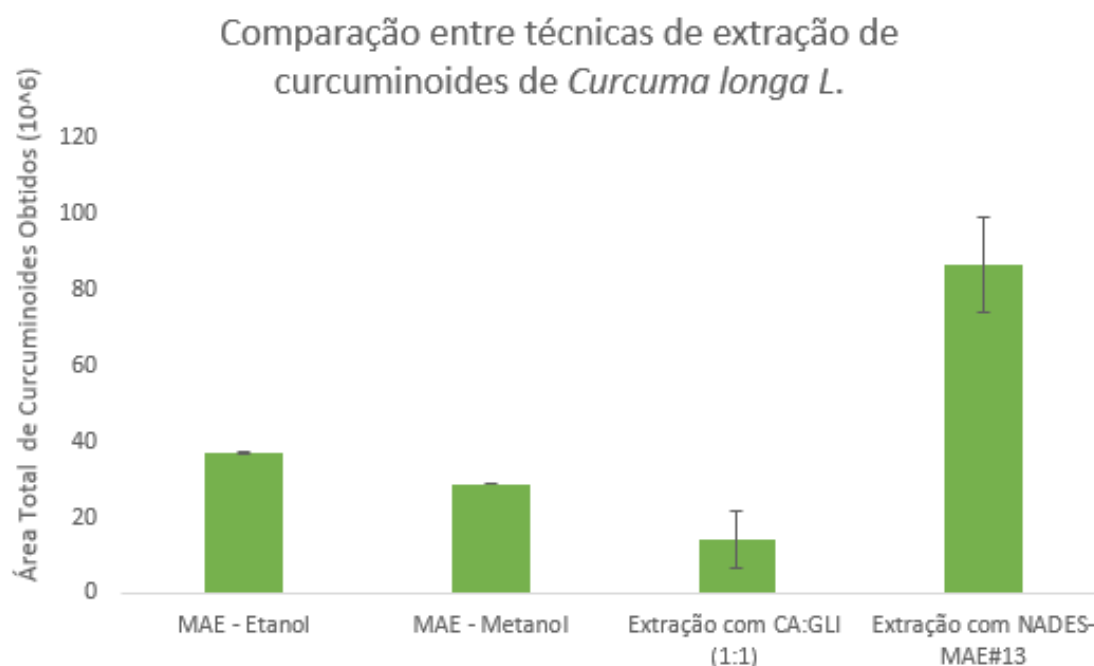


Figura 22- Comparação de técnicas de extração de curcuminoides de *C. longa* L.

#### 4.10 A métrica AGREE (*Analytical GREENess*) como indicativo do potencial verde dos métodos desenvolvidos

Para se avaliar o potencial verde dos dois métodos desenvolvidos, foi aplicada a métrica AGREE (*Analytical GREENess*). Esta métrica, baseia-se nos 12 princípios da Química Analítica Verde, para avaliar os processos do desenvolvimento científico analítico, aplicando valores de 0 a 1 para cada princípio da Química Analítica Verde, onde o resultado 1, indica um processo que está mais de acordo com o parâmetro em questão, considerando-o mais verde. Estas medidas são realizadas a partir de alguns parâmetros pré-estipulados sobre a utilização de solventes e determinados equipamentos, por exemplo, indicam valores diferentes na escala de 0 a 1 (PENA- PEREIRA *et al.* 2020).

Os valores expressos na Tabela 17 indicam os resultados obtidos pela métrica AGREE, em que cada princípio da Química Analítica Verde foi pontuado e o resultado total está indicado na Figura 22. Para comparação entre os métodos foram mensurados tanto o método de análise por CLAE quanto o método de extração.

Tabela 17 – Valores obtidos pela métrica AGREE para os métodos desenvolvidos e para as reproduções da literatura.

| Princípios da GAC | Método hNADES-MAE* | Método EtOH-MAE (LI; NGADI; MA; 2014) | Método MeOH-MAE (BENER <i>et al.</i> , 2016) | Método NADES CA:GLi (LIU <i>et al.</i> , 2019) |
|-------------------|--------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 1                 | 0,30               | 0,30                                  | 0,30                                         | 0,30                                           |
| 2                 | 0,87               | 0,87                                  | 0,86                                         | 0,87                                           |
| 3                 | 0,33               | 0,33                                  | 0,33                                         | 0,33                                           |
| 4                 | 1                  | 1                                     | 1                                            | 1                                              |
| 5                 | 0,5                | 0,5                                   | 0,5                                          | 0,5                                            |
| 6                 | 1                  | 1                                     | 1                                            | 1                                              |
| 7                 | 0,42               | 0,31                                  | 0,07                                         | 0,31                                           |
| 8                 | 0,44               | 0,44                                  | 0,44                                         | 0,44                                           |
| 9                 | 0,75               | 0,5                                   | 0,5                                          | 0,5                                            |
| 10                | 1                  | 0,5                                   | 0,5                                          | 0,75                                           |
| 11                | 1                  | 1                                     | 0,5                                          | 1                                              |
| 12                | 0,8                | 0,8                                   | 0,7                                          | 0,8                                            |

\* Método desenvolvido neste trabalho.

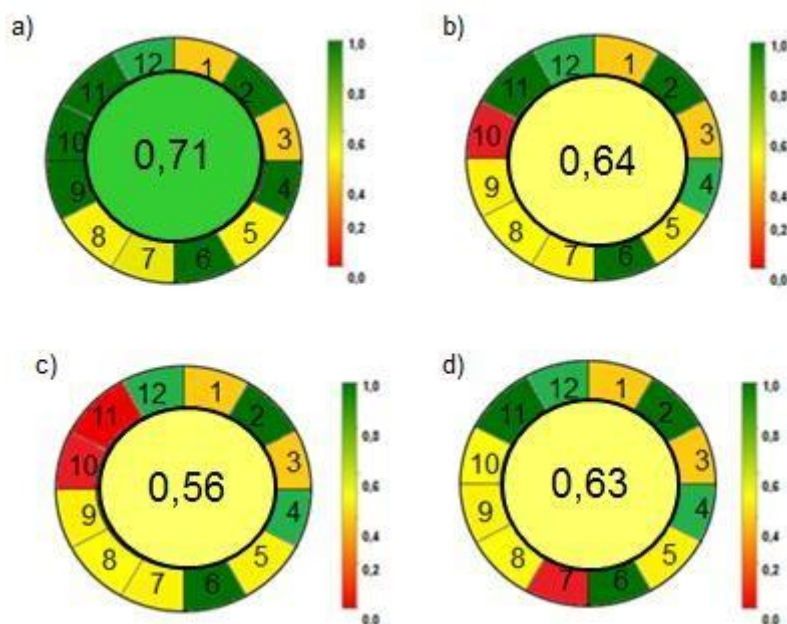


Figura 23- Pictogramas contendo os escores pela métrica AGREE para a) Método verde desenvolvido hNADES-MAE, b) Método adaptado de LI; NGADI; MA (2014) EtOH-MAE, c) Método adaptado de BENER et al (2016) MeOH-MAE; d) Método adaptado de LIU et al (2019) NADES CA:GLI 1:1.

A pontuação geral é mostrada no meio do pictograma com valores próximos a 1, no qual a coloração verde escura indica que o método avaliado é mais verde. O desempenho do procedimento em cada um dos critérios de avaliação foi refletido na cor do segmento com o número correspondente do critério.

Os resultados obtidos pela métrica AGREE indicam que o método desenvolvido para a extração de curcuminoides do açafrão-da-terra por hNADES-MAE e posterior análise por HPLC-PAD/UV-Vis (Figura 23a) é o que apresenta a maior abrangência dos princípios da Química Analítica Verde, podendo ser classificado como um método verde. As maiores pontuações obtidas pela métrica foram alcançadas devido ao fato de o método ser multivariável, ter utilizado solventes de baixa toxicidade (EtOH e hNADES), e por ter utilizado MAE como técnica de extração, que proporciona uma baixa demanda energética e alta eficiência extratora.

## 5. CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou que o Solvente Eutético Natural Hidrofóbico (hNADES) constituído por timol e mentol (1:1 m/m) apresentou alta eficiência extratora de curcuminoides do açafrão quando comparado com solventes tradicionais e NADES hidrofílicos. Além disso, o hNADES de timol e mentol é um solvente de baixa viscosidade e simples preparo, que necessita de menor número de experimentos, sua composição possui compostos de baixa toxicidade, resultando em menor impacto ambiental e mais seguro para a saúde humana. Após a otimização das condições de extração, o hNADES mencionado apresentou capacidade extratora 43% superior à de solventes tradicionalmente utilizados em extrações de curcuminoides, como as misturas hidroalcoólicas com metanol e etanol, solventes geralmente utilizados em grandes quantidades em uma ampla gama de processos analíticos.

Além método de extração, foi desenvolvido neste trabalho um método de análise de curcuminoides por HPLC-PAD que possui muitas vantagens ecológicas e sustentáveis, como compatibilidade ambiental, baixo custo, rapidez e menor consumo de energia, sendo baseado na utilização de etanol de cereais, de origem renovável. Adicionalmente, o método verde apresentou altos níveis de GCF (*Green Chromatographic Fingerprinting*) e de Resolução para os curcuminoides estudados, pois o desenvolvimento foi baseado no emprego de uma abordagem multiparamétrica de planejamento de experimentos envolvendo cinco variáveis, e que está de acordo com os princípios da Química Verde e da Química Analítica Verde, ao se tratar de uma diminuição significativa de experimentos necessários em detrimento a tentativa e erro.

Por serem alternativas viáveis, espera-se que os métodos desenvolvidos possam ser considerados como possíveis candidatos à substituição dos métodos de análise tradicionais, utilizados rotineiramente em diversos laboratórios ao redor do mundo e que se utilizam de grandes quantidades de solventes problemáticos, como acetonitrila e metanol.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram por fim, a possibilidade da mudança de uma estrutura científica antiga baseada na utilização de solventes

e técnicas tradicionais, mostrando-se como mais um avanço da Química Verde em guiar o desenvolvimento sustentável do conhecimento científico de maneira eficaz e segura.

## REFERÊNCIAS

AHSAN, Haseeb *et al.* Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Chemico-Biological Interactions*, v. 121, n. 2, p. 161–175, 1999.

AL-AKAYLEH, Faisal *et al.* Therapeutic deep eutectic system of capric acid and menthol: Characterization and pharmaceutical application. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 53, n. February, p. 101159, 2019.

AMALRAJ, Augustine *et al.* Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives – A review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, v. 7, n. 2, p. 205–233, 2017.

ANASTAS, P.T., WARNER, J.C. Green Chemistry: Theory and Practice. Oxford: Oxford University Press, 1998.

ARAIN, MB ; YILMAZ, E .; SOYLAK, M. Microextração de fase líquida assistida por ultra-som baseada em solvente eutético profundo para a determinação de cobalto por FAAS . *J. Mol. Liq.* **2016** , 224 , 538 - 543

ARMENTA, Sergio; GARRIGUES, Salvador; DE LA GUARDIA, Miguel. The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 71, p. 2–8, 2015.

BENER, Mustafa *et al.* Optimization of microwave-assisted extraction of curcumin from *Curcuma longa* L. (Turmeric) and evaluation of antioxidant Activity in Multi-Test systems. *Records of Natural Products*, v. 10, n. 5, p. 542–554, 2016.

BIANCHINI, F.; POSSEBON, F. Ayurveda. Medicina tradicional. Sistema do dosha. *Caminhos*, p. 8–21, 2014.

BROUET, I.; OHSHIMA, H. *Curcumin, an Anti-tumor Promoter and Anti-inflammatory Agent, Inhibits Induction of Nitric Oxide Synthase in Activated Macrophages. Biochemical and Biophysical Research Communications*. [S.l.: s.n.], 1995

CALCAGNO, Danielle Q. *et al.* Role of histone acetylation in gastric cancer: Implications of dietetic compounds and clinical perspectives. *Epigenomics*, v. 11, n. 3, p. 349–362, 2019.

CAO, Chen *et al.* *Multiple Hydrogen-Bonding Interactions Enhance the Solubility of Starch in Natural Deep Eutectic Solvents: Molecule and Macroscopic Scale Insights*. [S.l: s.n.], 2019. v. 67.

CAO, Jun *et al.* Well-Designed Hydrophobic Deep Eutectic Solvents As Green and Efficient Media for the Extraction of Artemisinin from *Artemisia annua* Leaves. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, v. 5, n. 4, p. 3270–3278, 2017.

CELEBIOGLU, Asli; YILDIZ, Zehra Irem; UYAR, Tamer. Thymol/cyclodextrin inclusion complex nanofibrous webs: Enhanced water solubility, high thermal stability and antioxidant property of thymol. *Food Research International*, v. 106, p. 280–290, 2018.

CHEMAT, Farid *et al.* Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 118, p. 248–263, 2019.

CHOI, Young Hae *et al.* Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiology*, v. 156, n. 4, p. 1701–1705, 2011.

CHOONARA, Bibi F. *et al.* A Menthol-Based Solid Dispersion Technique for Enhanced Solubility and Dissolution of Sulfamethoxazole from an Oral Tablet Matrix. *AAPS PharmSciTech*, v. 16, n. 4, p. 771–786, 2015.

CVJETKO BUBALO, Marina *et al.* New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food and Bioprocess Processing*, v. 109, p. 52–73, 2018.

DA SILVA, Dariane Trivisio *et al.* Natural deep eutectic solvent (NADES)-based blueberry extracts protect against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Food Research International*, v. 138, n. September, 2020.

DAI, Yuntao *et al.* Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. *Journal of Chromatography A*, v. 1434, p. 50–56, 2016.

DAI, Yuntao; WITKAMP, Geert Jan; *et al.* Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *carthamus tinctorius* L. *Analytical Chemistry*, v. 85, n. 13, p. 6272–6278, 2013.

DAI, Yuntao; VAN SPRONSEN, Jaap; *et al.* Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, v. 766, p. 61–68, 2013.

DE FARIA, Emanuelle L.P. *et al.* Deep eutectic solvents as efficient media for the extraction and recovery of cynaropicrin from *cynara cardunculus* L. Leaves. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 11, 2017.

DUAN, Li *et al.* Comprehensive Evaluation of Deep Eutectic Solvents in Extraction of Bioactive Natural Products. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, v. 4, n. 4, p. 2405–2411, 2016.

DURAND, Erwann; LECOMTE, Jérôme; VILLENEUVE, Pierre. From green chemistry to nature: The versatile role of low transition temperature mixtures. *Biochimie*, v. 120, p. 119–123, 2016.

DWAMENA, Amos K. Recent advances in hydrophobic deep eutectic solvents for extraction. *Separations*, v. 6, n. 1, 2019.

EL ACHKAR, Tracy; FOURMENTIN, Sophie; GREIGE-GERGES, Hélène. Deep eutectic solvents: An overview on their interactions with water and biochemical compounds. *Journal of Molecular Liquids*, v. 288, p. 111028, 2019.

ESPINO, Magdalena *et al.* Natural designer solvents for greening analytical chemistry. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 76, p. 126–136, 2016.

FERNÁNDEZ, María de los Ángeles *et al.* Natural deep eutectic solvents-mediated extractions: The way forward for sustainable analytical developments. *Analytica Chimica Acta*, v. 1038, p. 1–10, 2018.

FERRARI, Erika *et al.* Metal binding ability of curcumin derivatives: A theoretical vs. experimental approach. *Dalton Transactions*, v. 42, n. 15, p. 5304–5313, 2013.

FILHO, E. *Planejamento fatorial em química*. [S.l.]: EdUfscar, 2015.

FRANCISCO, María; VAN DEN BRUINHORST, Adriaan; KROON, Maaïke C. Low-transition-temperature mixtures (LTTMs): A new generation of designer solvents. *Angewandte Chemie - International Edition*, v. 52, n. 11, p. 3074–3085, 2013.

FUNARI, Cristiano Soleo *et al.* Green chromatographic fingerprinting: An environmentally friendly approach for the development of separation methods for fingerprinting complex matrices. *Journal of Separation Science*, v. 37, n. 1–2, p. 37–44, 2014.

GAŁUSZKA, Agnieszka; MIGASZEWSKI, Zdzisław; NAMIEŚNIK, Jacek. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 50, p. 78–84, 2013.

GOMEZ, Federico J.V. *et al.* A Greener Approach to Prepare Natural Deep Eutectic Solvents. *ChemistrySelect*, v. 3, n. 22, p. 6122–6125, 2018.

GÓMEZ, Analía V. *et al.* Effects of Microwave and Water Incorporation on Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) and Their Extraction Properties. *Advances in Food Science and Engineering*, v. 2, n. 4, p. 125–135, 2018.

GUTIÉRREZ, María C. *et al.* Freeze-drying of aqueous solutions of deep eutectic solvents: A suitable approach to deep eutectic suspensions of self-assembled structures. *Langmuir*, v. 25, n. 10, p. 5509–5515, 2009.

HE, Xian Guo *et al.* Liquid chromatography-electrospray mass spectrometric analysis of curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (*Curcuma longa*). *Journal of Chromatography A*, v. 818, n. 1, p. 127–132, 1998.

HIBBERT, D. Brynn. Experimental design in chromatography: A tutorial review. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 910, p. 2–13, 2012.

ICH, ICH topic Q2 (R1) validation of analytical procedures: text and methodology. Int. Conf. Harmon, 2005.

JADHAV, B. K.; MAHADIK, K. R.; PARADKAR, A. R. Development and validation of improved reversed phase-HPLC method for simultaneous determination of curcumin, demethoxycurcumin and bis-demethoxycurcumin. *Chromatographia*, v. 65, n. 7–8, p. 483–488, 2007.

LENARDÃO, Eder João *et al.* “Green chemistry” - Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Química Nova*, v. 26, n. 1, p. 123–129, 2003.

LI, Ming; NGADI, Michael O.; MA, Ying. Optimisation of pulsed ultrasonic and microwave-assisted extraction for curcuminoids by response surface methodology and kinetic study. *Food Chemistry*, v. 165, p. 29–34, 2014.

LIANG, Yizeng; XIE, Peishan; CHAU, Footim. Chromatographic fingerprinting and related chemometric techniques for quality control of traditional Chinese medicines. *Journal of Separation Science*, v. 33, n. 3, p. 410–421, 2010.

LIU, Yanhong *et al.* Enhanced extraction of natural pigments from *Curcuma longa* L. using natural deep eutectic solvents. *Industrial Crops and Products*, v. 140, n. July, p. 111620, 2019.

MICHALSKA-SIONKOWSKA, Marta; WALCZAK, Maciej; SIONKOWSKA, Alina. Antimicrobial activity of collagen material with thymol addition for potential application as wound dressing. *Polymer Testing*, v. 63, p. 360–366, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.polymertesting.2017.08.036>>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária -. Farmacopeia Brasileira, 6<sup>a</sup> edição - Volume 1. *Farmacopeia Brasileira*, 6<sup>a</sup> edição, v. 1, p. 1–739, 2019.

MONDAL, Satyajit; GHOSH, Soumen; MOULIK, Satya P. Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV–visible and steady-state fluorescence spectral study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 158, p. 212–218, 2016.

MORRISON, Henry G.; SUN, Changquan C.; NEERVANNAN, Sesha. Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 378, n. 1–2, p. 136–139, 2009.

NAM, Min Woo *et al.* Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: Application to flavonoid extraction from *Flos sophorae*. *Green Chemistry*, v. 17, n. 3, p. 1718–1727, 2015.

NETO, B.; SCARMINIO, I.; BRUNS, R. Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na Ciência e na indústria. 2001.

PACHECO-FERNÁNDEZ, Idaira; PINO, Verónica. Green solvents in analytical chemistry. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, v. 18, p. 42–50, 2019.

PAIVA, Alexandre *et al.* Natural deep eutectic solvents - Solvents for the 21st century. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, v. 2, n. 5, p. 1063–1071, 2014.

PATIL, Sujata S.; PATHAK, Ajay; RATHOD, Virendra K. Optimization and kinetic study of ultrasound assisted deep eutectic solvent based extraction: A

greener route for extraction of curcuminoids from *Curcuma longa*. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 70, n. July 2020, p. 105267, 2021.

PAVIA, Donald L. *et al. Introduction to Spectroscopy*. 4. ed. Washington: Brooks/Cole, Cengage Learning, 2009.

PENA-PEREIRA, F.; WOJNOWSKI, W.; TOBISZEWSKI, M. AGREE – Analytical GREENness Metric Approach and Software, *Analytical Chemistry* 92, p.10076-10082, 2020.

PRAT, Denis *et al.* CHEM21 selection guide of classical- and less classical-solvents. *Green Chemistry*, v. 18, n. 1, p. 288–296, 2015.

PRIYADARSINI, Kavirayani Indira. The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. *Molecules*, v. 19, n. 12, p. 20091–20112, 2014.

PURPURA, Martin *et al.* Analysis of different innovative formulations of curcumin for improved relative oral bioavailability in human subjects. *European Journal of Nutrition*, v. 57, n. 3, p. 929–938, 2018.

RADOŠEVIĆ, Kristina *et al.* Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. *LWT - Food Science and Technology*, v. 73, p. 45–51, 2016.

RAJAKUMAR, D. V.; RAO, M. N.A. Antioxidant properties of dehydrozingerone and curcumin in rat brain homogenates. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 140, n. 1, p. 73–79, 1994.

REVATHY, S *et al.* Isolation , Purification and Identification of Curcuminoids from Turmeric ( *Curcuma longa* L .) by Column Chromatography. *Journal of Experimental Sciences*, v. 2, n. 7, p. 21–25, 2011.

RIBEIRO, Bernardo D. *et al.* Menthol-based eutectic mixtures: Hydrophobic low viscosity solvents. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, v. 3, n. 10, p. 2469–2477, 2015.

RUESGAS-RAMÓN, Mariana; FIGUEROA-ESPINOZA, Maria Cruz; DURAND, Erwann. Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 65, n. 18, p. 3591–3601, 2017.

SANTANA, Ana P.R. *et al.* Sustainable synthesis of natural deep eutectic solvents (NADES) by different methods. *Journal of Molecular Liquids*, v. 293, p. 17–20, 2019.

SCHOLZE, A. F. A. Biodisponibilidade da curcumina. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica Funcional*, v. 14, n. 60, p. 20–24, 2014.

SHOBA, Guido *et al.* Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Medica*, v. 64, n. 4, p. 353–356, 1998.

SNYDER, L.; KIRKLAND, J.; GLAJCH, J. *Practical HPLC Development*. . [S.l: s.n.], 1997

SOUZA, O *et al.* Eco-friendly and inexpensive food grade bioethanol for *Eugenia uniflora* L. chromatographic fingerprinting: a trade-off between separation and sustainability. *Phytochemistry Letters* (JCR 2019: 1,459).

SUETH-SANTIAGO, Vitor *et al.* *Quim. Nova*, v. 38, n. 4, p. 538–552, 2015.

SUTTON, Adam T. *et al.* Natural deep eutectic solvents as the major mobile phase components in high-performance liquid chromatography—searching for alternatives to organic solvents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 410, n. 16, p. 3705–3713, 2018.

TERESHATOV, E. E.; BOLTOEVA, M. Yu; FOLDEN, C. M. First evidence of metal transfer into hydrophobic deep eutectic and low-transition-temperature mixtures: Indium extraction from hydrochloric and oxalic acids. *Green Chemistry*, v. 18, n. 17, p. 4616–4622, 2016.

TISTAERT, Christophe; DEJAEGER, Bieke; HEYDEN, Yvan Vander. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 690, n. 2, p. 148–161, 2011.

TØNNESEN, Hanne Hjorth. Chemistry of Curcumin and Curcuminoids. p. 143–153, 1992.

VAN OSCH, Dannie J.G.P. *et al.* A Search for Natural Hydrophobic Deep Eutectic Solvents Based on Natural Components. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, v. 7, n. 3, p. 2933–2942, 2019.

VAN OSCH, Dannie J.G.P. *et al.* Hydrophobic deep eutectic solvents as water-immiscible extractants. *Green Chemistry*, v. 17, n. 9, p. 4518–4521, 2015.

VERA CANDIOTI, Luciana *et al.* Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*, v. 124, p. 123–138, 2014.

VIAN, Maryline *et al.* Green solvents for sample preparation in analytical chemistry. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, v. 5, p. 44–48, 2017.

WAKTE, P. S. *et al.* Optimization of microwave, ultra-sonic and supercritical carbon dioxide assisted extraction techniques for curcumin from *Curcuma longa*. *Separation and Purification Technology*, v. 79, n. 1, p. 50–55, 2011.

WEI, Zuo Fu *et al.* Fast and green extraction and separation of main bioactive flavonoids from *Radix Scutellariae*. *Industrial Crops and Products*, v. 63, p. 175–181, 2015.

WEI, Zuofu *et al.* Application of natural deep eutectic solvents for extraction and determination of phenolics in *Cajanus cajan* leaves by ultra performance liquid chromatography. *Separation and Purification Technology*, v. 149, p. 237–244, 2015.

WELCH, C.J. *et al.* Performance to burn? Re-evaluating the choice of acetonitrile as the platform solvent for analytical HPLC. *Green chemistry*, 2009.

WU, Hejun *et al.* Development and characterization of antimicrobial protein films based on soybean protein isolate incorporating diatomite/thymol complex. *Food Hydrocolloids*, v. 110, n. July 2020, p. 106138, 2021.

YILDIZ, Zehra Irem *et al.* Menthol/cyclodextrin inclusion complex nanofibers: Enhanced water-solubility and high-temperature stability of menthol. *Journal of Food Engineering*, v. 224, p. 27–36, 2018.

ZHAN, Pei Yin *et al.* High-efficient column chromatographic extraction of curcumin from *Curcuma longa*. *Food Chemistry*, v. 129, n. 2, p. 700–703, 2011.

ZHAO, Bing Yi *et al.* Biocompatible Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride: Characterization and Application to the Extraction of Rutin from *Sophora japonica*. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, v. 3, n. 11, p. 2746–2755, 2015.