

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - UNIRIO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO - PPGAN

Fernanda de Sousa Bezerra

ESTUDO DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NATURAIS NA EXTRAÇÃO,
ESTABILIDADE E APLICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE FARELO DE
GIRASSOL

Rio de Janeiro – RJ

2020

Fernanda de Sousa Bezerra

ESTUDO DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NATURAIS NA EXTRAÇÃO,
ESTABILIDADE E APLICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE FARELO DE
GIRASSOL

Dissertação de Mestrado apresentada em cumprimento às exigências Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Gabriela Bello Koblitz

Coorientadora: Prof^a Dr^a Danielly C. Ferraz da Costa

Rio de Janeiro - RJ
2020

Catálogo informatizado pelo(a) autor(a)

d574 de Sousa Bezerra, Fernanda
Estudo de solventes eutéticos profundos naturais na extração, estabilidade e aplicação de compostos fenólicos de farelo de girassol. / Fernanda de Sousa Bezerra. -- Rio de Janeiro, 2020.
104

Orientadora: Maria Gabriela Bello Koblitz.
Coorientadora: Danielly C. Ferraz da Costa.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, 2020.

1. solventes eutéticos profundos naturais. 2. farelo de girassol. 3. compostos fenólicos. 4. câncer de mama. 5. subprodutos. I. Bello Koblitz, Maria Gabriela, orient. II. Ferraz da Costa, Danielly C., coorient. III. Título.

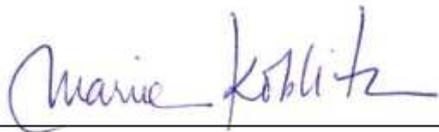
Fernanda de Sousa Bezerra

ESTUDO DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NATURAIS NA EXTRAÇÃO,
ESTABILIDADE E APLICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE FARELO DE
GIRASSOL

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Alimentos e
Nutrição da Universidade Federal do Estado do
Rio de Janeiro

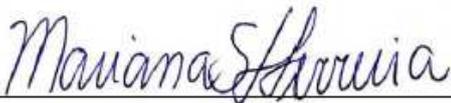
Aprovada em 18/06/2020

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Maria Gabriela Bello Koblitz

UNIRIO – Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição



Prof. Dra. Mariana Simões Larraz Ferreira

UNIRIO – Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição



Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane

UERJ – Programa de Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde

Para minha mãe, que me ensinou o valor do estudo
E meu *adorável* irmão, revisor oficial

Agradecimentos

Queria agradecer primeiramente a minha mãe, por me criar, educar e aturar durante toda a minha vida. Por ter ensinado a mim e meu irmão, o valor que tem o estudo e nos incentivado neste caminho desde nossa infância, mesmo que significasse sacrifícios no final do mês. Tudo que faço é pra tentar te deixar o mais orgulhosa possível.

Em seguida, agradeço a meu amor, Alef. Obrigada por estar sempre ao meu lado, mesmo quando estou errada, pelos Reiki quando estava extremamente ansiosa ou estressada e por tudo que você fez e faz por mim, não sei o que seria de mim sem você. O que as olimpíadas uniram, distância e quarentena nenhuma é capaz de afastar. Você também é meu orgulho! Te amo muito.

Obrigada ao meu irmão e meu cunhado, Guilherme e Raphael, os melhores professores de português e afins, pelo suporte ortográfico tão necessário nessa vida acadêmica e pela melhor sobrinha canina que eu poderia ter, Zoé.

Um agradecimento mais que especial para minha orientadora, Professora Gabriela, que me recebeu de braços abertos pra essa nova fase e me atura desde a graduação. A vida acadêmica é muito mais divertida e enriquecedora com você. Muito obrigada!!!

Também a minha coorientadora, Professora Danielly, que me ensinou tudo sobre células, abriu as portas do LEING na UERJ para mim e aceitou participar dessa jornada. Obrigada a todos os professores do PPGAN que foram muito receptivos.

A CAPES, pelo financiamento da minha bolsa de ensino.

Gostaria de agradecer a minha banca por aceitarem o convite de participação da minha defesa.

Obrigada Anninha, Roberta, Ingrid, Nathália, Milena, Carol, Helena, Giovana, Jussara, Andrea e a todos do laboratório, que me ajudaram seja em uma análise, a rir quando as coisas não saiam como planejado ou só pela companhia. A todos da UERJ que me auxiliaram durante as análises também.

A todos os meus amigos, que me apoiaram e ficaram felizes por mim quando iniciei meu mestrado. E (de novo) me aturaram e/ou ficaram no vácuo durante esse período de quarentena enquanto estava escrevendo minha dissertação.

Por último, mas não menos importante, em memória ao meu avô Antônio Bezerra que se foi antes que eu pudesse lhe contar que sua neta se tornaria mestre, mas que com certeza esteve ao meu lado e vai ver seu sobrenome ganhar reconhecimento pela sua neta *preferida*.

Obrigada a Deus, pela oportunidade de fazer o que amo e aprender coisas incríveis todos os dias.

BEZERRA, F.S. Estudo de solventes eutéticos profundos naturais na extração, estabilidade e aplicação de compostos fenólicos de farelo de girassol.

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma planta oleaginosa anual nativa da América do Norte. Em 2019 os maiores produtores foram Ucrânia, Rússia e União Europeia. Na América Latina, o Brasil não se encontra uma grande produção desta semente, sendo mais expressiva na região no Centro-Sul. A maior parte da produção é usada para obtenção de óleo que, quando prensado a frio, gera a torta do girassol, e ainda ser usada para uma segunda extração com solvente, dando origem ao farelo de girassol, ambos coprodutos pouco rentáveis para a indústria, mas ricos em compostos fenólicos e proteínas. Os compostos fenólicos presentes em maior quantidade são os ácidos clorogênicos, que representam cerca de 70% dos compostos fenólicos que, por sua vez, podem chegar a 4% da massa seca do farelo. Os solventes eutéticos profundos naturais (NADES) se dão pela mistura de dois ou mais componentes derivados de metabólitos primários e sais quaternários com baixo ponto de fusão, porém miscíveis em temperatura ambiente, e vem sendo estudados por serem atóxicos e não inflamáveis. Diferentes compostos fenólicos possuem atividade antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, entre outras, que podem ser potencializadas quando dissolvidos em NADES. Esta dissertação teve por objetivo investigar a extração de compostos fenólicos do farelo de girassol, utilizando diferentes formulações de NADES, bem como a ação citotóxica dos extratos obtidos em linhagem de célula humana de câncer. Foram combinados ácido lático, ácido cítrico, glicose, sacarose, cloreto de colina e glicerol em relação molar e temperatura adequada para formação dos NADES e escolhidos os dois solventes com melhor potencial de extração para realização de um estudo de estabilidade ao calor, luz e diferentes formas de armazenamento e aplicação em células linhagens de células de câncer de mama para avaliação citotóxica dos extratos obtidos por NADES e dos mesmos puros. Os melhores NADES na extração de compostos fenólicos foram as combinações de ácido lático:glicose (5:1) e cloreto de colina:glicerol (1:1), na avaliação da estabilidade e no ensaio de citotoxicidade o NADES de ácido lático:glicose teve melhores resultados. Não foram encontrados na literatura estudos que tenham aplicado NADES na extração, estabilidade e aplicação de compostos fenólicos do farelo de girassol.

Palavras-Chave: *Helianthus annuus* L., NADES, ácido clorogênico, câncer de mama, coprodutos

BEZERRA, F.S. Study of deep natural eutectic solvents in the extraction, stability and application of phenolic compounds from sunflower meal.

The sunflower (*Helianthus annuus L.*) is an annual oil plant native to North America. In 2019, the largest producers were Ukraine, Russia and the European Union. In Latin America, Brazil does not have a large production of this seed, it is more expressive in the Center-South region. Most of the world's production is used to obtain oil that, when cold pressed generates the sunflower cake, which can also be used for solvent extraction, originating the sunflower meal; both by-products that are not very profitable for the industry, but are rich in phenolic compounds and proteins. The phenolic compounds that are present in greater quantity are chlorogenic acids, which represent about 70% of the phenolic compounds, which, in turn, can run to 4% of the dry mass of the meal. Natural deep eutectic solvents (NADES) occur by mixing two or more components derived from primary metabolites and quaternary salts with a low melting point, but miscible at room temperature and have been studied for being non-toxic and non-flammable. Different phenolic compounds have antioxidant, anti-tumor, anti-inflammatory activity, among others, which can be enhanced when dissolved in NADES. The aim of this dissertation was to investigate the extraction of phenolic compounds from sunflower meal, using different formulations of NADES, as well as the cytotoxic action of extracts obtained in human cancer cell line. Lactic acid, citric acid, glucose, sucrose, choline chloride and glycerol in molar ratio and appropriate temperature were combined to form the NADES and the two solvents with the best extraction potential were chosen to carry out a study of heat, light and different stability forms of storage and application in cell lines of breast cancer cells for cytotoxic evaluation of extracts obtained by NADES and of the same pure. The best NADES in the extraction of phenolic compounds were the combinations of lactic acid: glucose (5: 1) and choline chloride: glycerol (1: 1), in the stability assessment and in the cytotoxicity test the NADES of lactic acid: glucose had better results. No studies have been found in the literature that have applied NADES in the extraction, stability and application of phenolic compounds from sunflower bran.

Keywords: *Helianthus annuus L.*, natural deep eutectic solvents, chlorogenic acid, breast cancer, by-products

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1

Figura 1. 1. Morfologia do girassol	23
Figura 1. 2. Estrutura química do ácido quínico, ácidos trans-cinâmicos e do ácido 5-cafeoilquínico	24

Capítulo 2

Figura 2. 1. Estrutura química do (A) ácido hidroxibenzoico e (B) ácido elágico presentes nas nozes	34
Figura 2. 2. Compostos fenólicos (A) ácido cafeíco, (B) p-cumárico e (C) ferúlico presentes na amêndoa.	35
Figura 2. 3. Estruturas químicas de glicosídeos e agliconas de algumas das isoflavonas presentes na soja (A) daidzina, (B) daidzeína, (C) genisteína e (D) glicitina.	35
Figura 2. 4. Estruturas químicas dos principais compostos fenólicos da azeitona (A) oleuropeína, (B) hidroxitirosol, (C) ácido cafeíco e (D) vanilina.	36
Figura 2. 5. Estrutura química do ácido sinápico presente na palma.	37
Figura 2. 6. Estrutura química da sinapina presente na canola.....	38
Figura 2. 7. Estrutura química do ácido 5-cafeoilquínico presente no girassol.....	38
Figura 2. 8. Estrutura química dos principais compostos fenólicos do amendoim: (A) ácido coutárico e (B) ácido caftárico.....	39
Figura 2. 9. Esquema do ponto eutético de duas substâncias sólidas (S).....	41
Figura 2. 10. Estrutura química do (A) cloreto de colina e da (B) betaína.....	43

Capítulo 3

Figura 3. 1. Cromatogramas de uma repetição da injeção do extrato hidroetanólico (A), AL:G (B), CC:GL (C), AC:S (D) e CC:AC (E) do farelo de girassol a 320nm, diluído 25x, 50x, 50x, 100x e 100x respectivamente.	68
Figura 3. 2. Estabilidade ao calor dos extratos fenólicos do farelo de girassol. (A) 40°C; (B) 60°C; (C) 80°C. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre os tempos de tratamento no mesmo solvente.....	70

Figura 3. 3. Estabilidade ao armazenamento, em diferentes temperaturas, do extrato fenólico do farelo de girassol. (A) 8°C ± 4°C; (B) -18°C ± 3°C; (C) 25°C ± 4°C. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa ao longo do tempo de armazenamento no mesmo solvente.	72
Figura 3. 4. Estabilidade à luz do extrato fenólico do farelo de girassol. (A) Amostra; (B) Branco. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre os dias de tratamento no mesmo solvente	74
Figura Suplementar 3. 1. Quantificação de composto fenólicos totais em etanol (40%) e nos NADES testados	81
Figura Suplementar 3. 2. Cromatogramas de uma repetição da injeção do extrato hidroetanólico do farelo de girassol a (A) 260nm e (B) 280nm, diluído 25x, respectivamente.	81
Figura Suplementar 3. 3. Cromatogramas de uma repetição da injeção do extrato AL:G do farelo de girassol a (A) 260nm e (B) 280nm, diluído 50x, respectivamente.....	81
Figura Suplementar 3. 4. Cromatogramas de uma repetição da injeção do extrato CC:GL do farelo de girassol a (A) 260nm e (B) 280nm, diluído 50x, respectivamente.....	82

Capítulo 4

Figura 4. 1. Atividade citotóxica de NADES e extratos com compostos fenólicos na redução celular de linhagem tumoral MCF-7.	90
Figura Suplementar 4. 1. Atividade citotóxica do extrato hidroetanólico com compostos fenólicos na redução celular de linhagem tumoral MCF-7.	92

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 2. 1. Produção Mundial e Brasileira de oleaginosas.....	32
Tabela 2. 2. Composição de compostos fenólicos em coprodutos de oleaginosas.....	33
Tabela 2. 3. Composição dos tipos de DES com exemplos.	42
Tabela 2. 4. Resumo da literatura disponível sobre extração de compostos fenólicos de oleaginosas com uso de DES/NADES/THEDES.....	53

Capítulo 3

Tabela 3. 1. Combinações dos NADES preparados e relação molar	64
Tabela 3. 2. Composição dos NADES, concentração de compostos fenólicos, pH e atividade água.....	67
Tabela 3. 3. Valores médios de concentração de ácido clorogênico, tempo de retenção, área do pico dos cromatogramas nos extratos a 320 nm.	67

Tabela Suplementar 3. 1. Tempo de retenção e área do pico do ácido clorogênico na concentração de 10 mg/L.....	82
--	----

Tabela Suplementar 3. 2. Média e desvio padrão da estabilidade ao calor do extrato hidroetanólico, NADES formado por AL:G e CC:GL.	82
---	----

Tabela Suplementar 3. 3. Média e desvio padrão da estabilidade a luz artificial branca do extrato hidroetanólico, NADES formado por AL:G e CC:GL.....	83
---	----

Tabela Suplementar 3. 4. Média e desvio padrão da estabilidade ao armazenamento, em diferentes temperaturas do extrato hidroetanólico, NADES formado por AL:G e CC:GL.	83
---	----

Capítulo 4

Tabela Suplementar 4. 1. Média e desvio padrão da porcentagem de redução de células MCF-7 sobre os extratos hidroetanólico, extrato AL:G, CC:GL e NADES AL:G, CC:GL.....	92
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
2.1 GERAL	19
2.2 ESPECIFICOS	19
CAPÍTULO 1	20
1. FARELO DE GIRASSOL	21
2. COMPOSTOS FENÓLICOS	22
3. CÂNCER DE MAMA	25
CAPÍTULO 2	28
Aproveitamento integral de matérias-primas oleaginosas com solventes “verdes”: revisão e oportunidades	29
1. INTRODUÇÃO	31
2. OLEAGINOSAS – PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO FENÓLICA	32
3. EXTRAÇÃO POR SOLVENTES	39
3.1 SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS.....	40
3.2 SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NATURAIS	42
3.3 SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS TERAPÊUTICOS	44
3.4 ESTABILIDADE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS EM DES.....	44
4. USO DE DES EM OLEAGINOSAS	47
4.1 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE OLEAGINOSAS E SEUS COPRODUTOS COM USO DE DES	47
4.1.1 Folhas de noqueira	47
4.1.2 Óleo de Amêndoa.....	48
4.1.3 Produtos de soja	48
4.1.4 Azeitona: produtos e coprodutos.....	48
4.1.5 Coprodutos da palma.....	51
4.1.6 Farelo de Canola.....	51
4.1.7 Casca de amendoim.....	52
4.1.8 Brotos de grão de bico.....	52
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
CAPÍTULO 3	59
Solventes Eutéticos Profundos Naturais na extração e estabilidade dos compostos fenólicos de coproduto de girassol	60
1. INTRODUÇÃO	62

2. MATERIAL E MÉTODOS	63
2.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL	63
2.2 PREPARAÇÃO DOS SOLVENTES.....	63
2.3 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	64
2.4 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	64
2.4.1 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC	65
2.5 ESTUDO DA ESTABILIDADE.....	66
3. RESULTADOS	66
3.1 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	66
3.1.1 Identificação e quantificação por HPLC	67
3.2 ESTUDO DA ESTABILIDADE.....	68
3.2.1 Estabilidade ao calor	68
3.2.2 Estabilidade ao armazenamento	71
3.2.3 Estabilidade à luz	73
4. DISCUSSÃO	75
4.1 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	75
4.2 ESTUDO DA ESTABILIDADE.....	77
4.2.1 Estabilidade ao calor	77
4.2.2 Estabilidade ao armazenamento	78
4.2.3 Estabilidade à luz	79
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
CAPÍTULO 4	84
Atividade citotóxica de compostos fenólicos do farelo de girassol extraídos por NADES em células tumorais de mama MCF-7	85
1. INTRODUÇÃO	87
2. MATERIAL E MÉTODOS	88
2.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL	88
2.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	88
2.3 CULTURA DE CÉLULAS.....	88
2.4 ATIVIDADE CITOTÓXICA DO EXTRATO DE FARELO DE GIRASSOL SOBRE CÉLULAS HUMANAS DE CÂNCER DE MAMA EM CULTURA	89
2.5 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR REDUÇÃO DE ALAMAR BLUE®	89
3. RESULTADOS	89
3.1 ATIVIDADE CITOTÓXICA	89
4. DISCUSSÃO	90
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	91

APÊNDICES	92
CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS	94

1. INTRODUÇÃO

O girassol (*Helianthus annuus L.*) é uma planta nativa da América do Norte e é utilizada como fonte dietética na alimentação, para fabricação de óleo, para obtenção de corantes e como planta ornamental (DUNFORD et al., 2015). Segundo o USDA (*United States Department of Agriculture*), a sua produção mundial é de 50,55 milhões de toneladas, sendo ela liderada pela Ucrânia, com 15 milhões de toneladas no biênio 2018/19, seguida da Rússia e da União Europeia. O Brasil é o país da América do Sul com menor produção de girassol, com 0,05 milhões de toneladas por ano, sendo os maiores produtores Argentina e Paraguai (USDA, 2020). A região brasileira com maior parte da produção é a Centro-Sul, com 104,9 mil toneladas (CONAB, 2020).

O principal uso do girassol é para a produção de óleo, a partir da semente, sendo 90% do óleo produzido usado para consumo humano e 10% para produção de biodiesel e aplicações industriais (DUNFORD; MARTÍNEZ; SALAS, 2015). Como a maioria dos óleos vegetais, o óleo de girassol tem composição predominante de triacilgliceróis e pequena proporção de fosfolipídios (GUNSTONE, 2011).

O óleo é obtido de grãos inteiros ou parcialmente descascados, uma vez que a casca possui mecanismos de proteção natural, como ceras que, presentes no óleo, são insolúveis em baixas temperaturas (RABONATO et al., 2016). A partir da produção do óleo, é gerado um coproduto ao final do processamento, a torta – após a prensagem a frio; e o farelo – após extração por solvente do óleo residual presente na torta. Ambos são considerados coprodutos dessa indústria e, geralmente, destinados à ração animal, em virtude de seu alto conteúdo proteico (DUNFORD; MARTÍNEZ; SALAS, 2015).

Gentil (2012) demonstra que 45% da semente de girassol gera óleo, 25% casca e 30% farelo. Levando em consideração estas porcentagens, estima-se que, no Brasil, são produzidas cerca de 15 mil toneladas de farelo por ano. A semente de girassol é fonte de compostos fenólicos, cujas proporção e quantidade são afetadas pela variedade do girassol. Pelo menos dez tipos de compostos fenólicos já foram identificados, porém os principais são o ácido clorogênico, ácido cafeico e o ácido quínico (WEISZ; KAMMERER; CARLE, 2009).

Já estão disponíveis diversos estudos que procuram desvendar os efeitos benéficos dos compostos bioativos contra os diferentes tipos de câncer (MENENDEZ et al., 2007; NIEDZWIECKI et al., 2016; SÁNCHEZ-TENA et al., 2013). O consumo de alimentos ricos em tais compostos, como frutas, vegetais, grãos e outros, foi

evidenciado como um fator protetivo ao consumidor (MARTINS; PINHO; FERREIRA, 2017).

O câncer é um conjunto de doenças caracterizado pelo crescimento desordenado de células que sofrem uma alteração no DNA, levando-as a agir de modo atípico, invadindo tecidos e órgãos – esta divisão ocorre de forma rápida, dando a elas uma característica agressiva. Os tipos de câncer se diferenciam quanto ao tipo de célula atingida, velocidade de multiplicação celular e capacidade de invasão de tecidos e órgãos próximos ou não, sendo esta chamada metástase. A carcinogênese pode levar vários anos até a proliferação e geração de tumor e pode ser afetada ainda por agentes carcinógenos (INCA, 2019). A Organização Mundial de Saúde (OMS) prevê que no ano de 2040 mais de 29,5 milhões de indivíduos sejam diagnosticados com algum tipo de câncer no mundo. Destes, são esperados cerca de 970 mil de casos de câncer de mama (IARC, 2020a)

A extração convencional de compostos fenólicos de coprodutos alimentares é usualmente feita empregando solventes orgânicos voláteis como etanol, metanol e/ou acetona. Estes, porém, são reconhecidos como solventes tóxicos e/ou altamente inflamáveis (OZTURK; PARKINSON; GONZALEZ-MIQUEL, 2018). Atualmente, há a busca por uma química mais verde, cujo os princípios são segurança aos manipuladores, ao uso, ao ambiente e sustentáveis. Estes podem ser obtidos aplicando o uso de solventes biodegradáveis e mais eficientes, que agreguem valor a coprodutos (CVJETKO BUBALO et al., 2018). Uma alternativa de novo solvente verde são os chamados solventes eutéticos profundos ou DES (*deep eutectic solvents*) da sigla em inglês (CUNHA; FERNANDES, 2018; OZTURK; PARKINSON; GONZALEZ-MIQUEL, 2018).

Considerando a produção anual de farelo no Brasil, são descartadas, anualmente, cerca de 15 mil toneladas de ácido clorogênico. Esta dissertação pretendeu investigar a melhor forma de extração de compostos fenólicos do farelo desengordurado do girassol, utilizando diferentes formulações de solventes eutéticos profundos naturais, bem como a ação citotóxica dos extratos obtidos em linhagens de células humanas de câncer de mama MCF-7. Dessa forma, pretendemos agregar valor a este coproduto da fabricação do óleo de girassol, reduzindo o desperdício de compostos bioativos.

O capítulo 1 consiste em uma revisão bibliográfica clássica sobre as temáticas abordadas nesta dissertação.

O capítulo 2 consiste em um artigo de revisão bibliográfica, intitulado “Aproveitamento integral de matérias-primas oleaginosas com solventes “verdes”: revisão e oportunidades”. O artigo foi submetido à publicação na Revista Research, Society and Development. Com o objetivo de revisar a literatura disponível sobre a extração de compostos fenólicos de matérias-primas oleaginosas e seus coprodutos, com a utilização de DES, de modo a identificar as muitas oportunidades de pesquisa e aplicação ainda abertas nessa área de estudo.

Os métodos, resultados e discussão do presente estudo estão apresentados em capítulos, divididos como segue:

No capítulo 3 apresentam-se os resultados preliminares da análise de extração e estabilidade dos compostos fenólicos do farelo de girassol utilizando NADES. Neste estudo foram utilizadas diferentes combinações de NADES na extração de compostos fenólicos do farelo de girassol e foi avaliada a estabilidade sob luz, calor, temperatura ambiente, congelamento e refrigeração dos extratos em comparação à extração com um solvente orgânico, neste caso, etanol 40%.

No capítulo 4, apresentam-se os resultados preliminares da aplicação dos extratos selecionados em linhagens de células humanas de câncer de mama. Neste estudo, os extratos foram investigados quanto a sua atividade citotóxica em linhagem de células humana de câncer de mama MCF-7.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Obter extrato contendo compostos fenólicos, a partir do farelo desengordurado de girassol e utilizando diferentes formulações de solventes eutéticos profundos naturais e investigar sua atividade citotóxica sobre células de câncer de mama.

2.2 ESPECIFICOS

- Extrair os compostos fenólicos com oito combinações de solventes profundos eutéticos naturais e selecionar os dois melhores solventes com maior capacidade de extração de composto fenólicos.
- Avaliar a estabilidade ao calor, à luz, e ao armazenamento em diferentes temperaturas dos compostos fenólicos nos extratos selecionados.
- Avaliar a atividade citotóxica dos extratos selecionados sobre linhagens de células humanas de câncer de mama.

CAPÍTULO 1

1. FARELO DE GIRASSOL

O farelo de girassol é o coproduto gerado pela extração do óleo, por prensagem seguida de extração com solvente, das sementes de girassol parcialmente descascadas, que é destinado sobretudo para alimentação de ruminantes. Há, porém, um grande interesse, por parte da indústria, na utilização dos coprodutos industriais gerados a partir dos processamentos realizados – dessa forma, não há geração de resíduo, mas o aproveitamento integral da matéria-prima. Esses coprodutos são ricos em ingredientes funcionais, que podem ser aplicados na indústria, em produtos de panificação, nutrição e na promoção de saúde. Na nutrição humana, são fontes atrativas de proteína: esta, por sua vez, constitui ao menos metade da composição do farelo, que possui apenas pequenas quantidades de fatores anti-nutricionais ou tóxicos, quando comparado ao farelo de outras fontes oleaginosas (MARTINS; PINHO; FERREIRA, 2017; PICKARDT et al., 2011; WEISZ; KAMMERER; CARLE, 2009).

Dunford et al. (2015) afirma que o farelo possui 11 a 12 % de umidade, 38 a 40 % de proteína, 14 a 17 % de fibra e 0,5 % de lipídios. As proteínas da semente do girassol são basicamente albuminas (17 a 34% do total) e globulinas (50 a 70%). O único aminoácido essencial deficiente é a lisina, limitante também no farelo, que é, porém, rico em arginina e possui mais metionina do que o farelo de soja. A aplicação de altas temperaturas durante o processamento para obtenção do óleo de girassol pode afetar a digestibilidade negativamente de lisina no farelo (RAMACHANDRAN et al., 2007; SENKOYLU; DALE, 1999).

Apesar do alto valor proteico do farelo de girassol, a presença de compostos fenólicos prejudica a funcionalidade desta proteína: quando purificada, pela remoção dos compostos fenólicos, a fração proteica apresenta a capacidade de estabilizar emulsões e espumas. O complexo proteína-fenol altera a qualidade e funcionalidade das proteínas do girassol ainda de outras formas, tais como: diminuindo a solubilidade, reduzindo a digestibilidade e alterando as propriedades de cor e sabor. Quando em condições alcalinas ou por ação de polifenol-oxidases (PFO), as interações entre proteínas e compostos fenólicos se tornam irreversíveis. A ação enzimática torna os compostos fenólicos altamente reativos que, ao interagir com grupos de proteicos funcionais, causam reações de escurecimento, levando à destruição de aminoácidos essenciais, prejudicando a digestibilidade das proteínas e, possivelmente, levando à formação de compostos tóxicos (KAREFYLLAKIS et al., 2017; ZARDO et al., 2017).

No farelo de girassol, 79% dos compostos fenólicos são solúveis e 21% formam o complexo proteína-fenol (LOMASCOLO et al., 2012).

2. COMPOSTOS FENÓLICOS

Compostos fenólicos são substâncias aromáticas hidroxiladas que variam de estruturas monocíclicas a polímeros e que podem ser encontradas em cereais, hortaliças, frutas, chás, ervas, chocolate, café e vinho, entre outros produtos de origem vegetal (CHRIST-RIBEIRO et al., 2016). São compostos amplamente distribuídos: já foram detectados mais de 8.000 compostos fenólicos em plantas. Trata-se de produtos do metabolismo secundário vegetal, que podem ser pigmentos ou derivados de reações de defesa das plantas contra agressões (SILVA et al., 2010). Muitos desses compostos apresentam propriedades antialergênicas, antimicrobianas, antioxidantes, antitrombóticas, cardioprotetoras e vasodilatadoras (VICHAPONG et al., 2010).

Água, metanol e etanol, puros ou misturados, são usados para extrair compostos fenólicos de materiais vegetais. Extratos brutos de ervas e outros vegetais ricos em compostos fenólicos têm gerado interesse para a indústria de alimentos, pois esses compostos agem como antioxidantes. Além de doar hidrogênio ou elétrons, eles impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente lipídios, pois formam radicais intermediários estáveis, sendo capazes de retardar a degradação oxidativa da peroxidação lipídica, retardando a perda de qualidade e do valor nutricional dos alimentos (AYDEMIR; BECERIK, 2011; SILVA et al., 2010).

Taha (2011) otimizou a extração de compostos fenólicos do farelo de girassol utilizando metanol, etanol e acetona na concentração de 80%. A acetona, por ser menos polar, foi o solvente orgânico que obteve melhor rendimento, extraindo 1802,76 mg de compostos fenólicos/100g de farelo. Além da extração convencional foram utilizados ultrassom e micro-ondas, com os três solventes testados e a acetona teve melhores resultados nas duas estratégias aplicadas. Ye (2015) extraiu os compostos fenólicos do girassol – flores do raio e do estigma (Figura 1), utilizando solventes orgânicos e água. Nas flores do raio houve melhor rendimento com 90% metanol e nas do estigma não houve diferença entre 50% metanol, 90% metanol e 50% etanol.

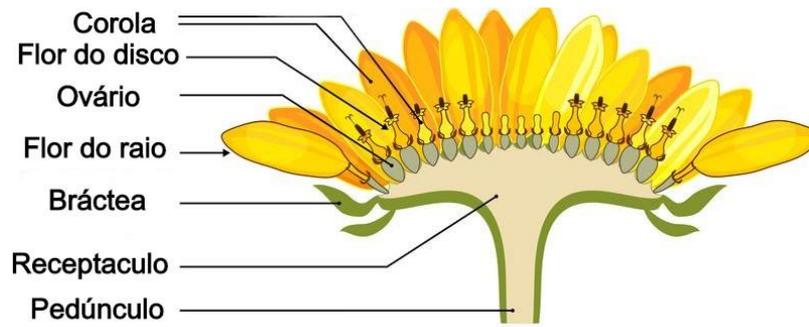


Figura 1. 1. Morfologia do girassol

O farelo de girassol possui naturalmente compostos fenólicos e, assim, estas moléculas bioativas podem apresentar atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, dentre outras (LAGUNA et al., 2018). O principal composto fenólico encontrado na semente do girassol é o ácido clorogênico, um ester do ácido cafeico e do ácido quínico. A quantidade de compostos fenólicos no girassol pode chegar a 4% da massa seca da semente, os principais ácidos presentes são o ácido cafeico, ácido quínico e o ácido clorogênico, sendo este em maior quantidade, representando até 70% da massa seca dos compostos fenólicos (KAREFYLLAKIS et al., 2017; PEDROSA et al., 2000; WEISZ; KAMMERER; CARLE, 2009).

Alto conteúdo de ácido clorogênico livre é consumido junto à proteína, gerando aminoácidos primários e formação de uma coloração verde nos produtos de semente de girassol, o que pode afetar propriedades nutricionais. Liang & Were (2018) demonstraram que, na produção de cookies, a partir de manteiga de girassol com diferentes tipos de açúcar, os que obtiveram coloração verde mais significativa foram aqueles que tinha pH mais alcalino e maior açúcar total; além disso, esses também tiveram conteúdo fenólico menor após cozimento e armazenamento (LIANG; WERE, 2018).

Alguns artigos apresentaram alternativas para a remoção dos compostos fenólicos antes da extração proteica. Weisz (2013) aplicou métodos de adsorção por resinas dos compostos fenólicos de coproduto de girassol, porém alguns parâmetros – pH, temperatura, tipo de eluente e concentração do soluto, afetaram o rendimento e o perfil fenólico do produto final (WEISZ; CARLE; KAMMERER, 2013).

Os ácidos clorogênicos (CQA) são a família de ésteres formados entre um ácido quínico esterificado a um dos ácidos trans-cinâmicos, representados na Fig. 2.

Ainda podem ser classificados como mono, di, tri e tetra ésteres e também como ésteres mistos dos ácidos cafeico e ferúlico. O mais comum e abundante é o 5-*O*-cafeoilquínico (5-CQA), o mono-éster do ácido cafeoilquínico (CLIFFORD, 2000; OLIVEIRA; BASTOS, 2011). Amostras de sementes e cascas de girassol desengorduradas foram avaliadas por HPLC para determinação de ácidos clorogênicos. O ácido fenólico predominante foi o 5-CQA, seguido do ácido neoclorogênico (3-CQA) e ácido criptoclorogênico (4-CQA) em ambas as amostras (WEISZ; CARLE; KAMMERER, 2013).

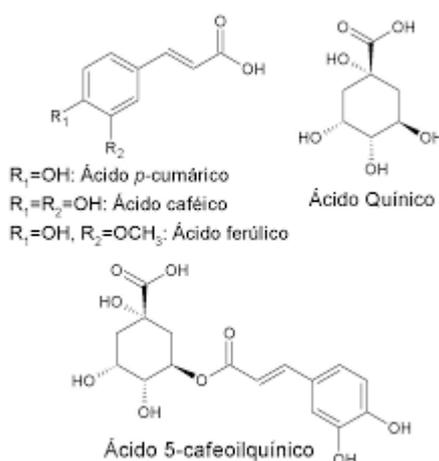


Figura 1. 2. Estrutura química do ácido quínico, ácidos trans-cinâmicos e do ácido 5-cafeoilquínico

A absorção dos ácidos clorogênicos por seres humanos foi evidenciada por meio do aumento da capacidade antioxidante do plasma após consumo de alimentos fonte. Sabe-se que a mucosa gastrointestinal não possui esterases para digestão dos CQA, reduzindo sua absorção no estômago e no intestino delgado, porém ácidos hidroxicinâmicos livres são facilmente absorvidos. Isto ocorre porque os CQA só conseguem ser absorvidos por transporte paracelular e os ácidos hidroxicinâmicos são absorvidos por transporte ativo (OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

O ácido clorogênico tem ação antibacteriana, anticarcinogênica, antioxidante, previne a oxidação lipídica, reduzindo a formação de radicais livres, e inibe a oxidação do LDL e do DNA *in vitro* (KAREFYLLAKIS et al., 2017; LIANG; WERE, 2018; PEDROSA et al., 2000).

3. CÂNCER DE MAMA

O câncer é um conjunto de doenças que causam o crescimento desordenado de células que sofrem uma alteração no DNA, levando-as a agir de modo atípico, invadindo tecidos e órgãos – esta divisão ocorre de forma rápida, dando a elas uma característica agressiva. Os tipos de câncer se diferenciam quanto ao tipo de célula atingida, velocidade de multiplicação celular e capacidade de invasão de tecidos e órgãos próximos ou não, sendo esta chamada metástase. A carcinogênese pode levar vários anos até uma proliferação significativa e geração de tumor e pode ser afetada ainda por agentes carcinógenos (INCA, 2019).

As células tumorais são compostas das mesmas estruturas biomoleculares de uma célula normal, que são necessárias para sobrevivência e funções básicas. Quando há uma falha nestas funções, há uma alteração no fenótipo e geração de uma célula tumoral. Na neoplasia, quatro funções básicas não são adequadamente executadas: a proliferação, diferenciação, organização cromossômica e a apoptose (HOLLAND; FREI, 2017). Hanahan & Weinberg (2017) propuseram que o câncer é constituído de oito marcos que juntas geram uma lógica de compreensão desta patologia, são elas: sinalização proliferativa sustentadora, impedimento de supressores de crescimento, resistência à morte celular, habilidade de replicação sem morte celular, indução da angiogênese, ativação da invasão e metástase, desregulação energética celular e metabólica e prevenção da destruição do sistema imune (HOLLAND; FREI, 2017).

Câncer de mama é uma doença na qual ocorre a proliferação desordenada de células malignas no tecido mamário. Segundo a OMS, esse é o tipo de câncer que apresenta a maior taxa de mortalidade entre mulheres e é o segundo com maior incidência em todo o mundo, com mais de 2 milhões de casos em 2018 em ambos os sexos, ficando atrás somente do câncer de pulmão. Esta patologia pode começar nos lóbulos, ductos ou tecido estromal, dando início ao processo carcinogênico. Os dois tipos mais comuns de câncer de mama são o invasivo ductal e o invasivo de mama lobular: estes, somados, representam 70% de todos os casos. Ainda há o muito raro, porém agressivo, câncer de mama metaplásico, além da diferenciação não glandular, representada por um grupo heterogêneo de tumores (BUDZIK et al., 2019; IARC, 2020a; JORDAN; KHAN; PRILL, 2018).

A maioria dos cânceres de mama são assintomáticos e são diagnosticados através da mamografia: alguns sintomas que podem ocorrer são inchaço mamário,

caroços firmes e fixos com bordas irregulares, mudanças na pele sobrejacente, retração do mamilo, entre outros. As mulheres têm diferentes níveis de risco ao câncer de mama, uma vez que há correlação com sua genética, vida reprodutiva e do ambiente em que se encontra. Entre os fatores de risco, estão a idade – mulheres acima de 50 anos, a história familiar de câncer de mama, nulíparas, obesidade e sedentarismo (DESREUX, 2018; JORDAN; KHAN; PRILL, 2018).

O diagnóstico precoce aumenta as chances de sobrevivência, tratamentos menos invasivos e maior qualidade de vida. Na Dinamarca, por exemplo, a mortalidade foi reduzida não só pelo diagnóstico por intermédio da mamografia, mas pela prevenção dos fatores de risco, citados acima, associados ao tratamento melhorado. Porém, o aumento do risco do desenvolvimento de câncer de mama é previsto para as próximas décadas, principalmente entre mulheres jovens, em virtude do aumento da incidência da diabetes e obesidade (DESREUX, 2018).

Mesmo com um aumento nos diagnósticos precoces de câncer e nas intervenções terapêuticas atuais, ainda há casos tanto de toxicidade quanto de resistência às drogas – destaca-se também o alto custo para o tratamento. Por este motivo, há um maior apelo ao uso de extratos de plantas, mais seguros e efetivos, dando início a novas estratégias de medicina preventiva ou à elaboração de novas drogas (OYENIHI; SMITH, 2019).

Os compostos fenólicos influenciam o metabolismo de pró-carcinógenos através da modulação da expressão das enzimas do citocromo P450, enzima de fase I responsável pela ativação dos carcinógenos, e facilitam sua excreção pelo aumento da expressão das enzimas de conjugação da fase II da detoxificação. A indução da fase II ativa a formação, a partir dos compostos fenólicos, de quinonas tóxicas, que são substrato das enzimas de detoxificação. Ao ingerir os compostos fenólicos, esse processo é ativado para eliminação das quinonas, mas acaba ajudando a induzir a defesa contra xenobióticos tóxicos (DHANASEKARAN; JAGANATHAN, 2018; PANDEY; RIZVI, 2009).

Além destes mecanismos clássicos, os compostos fenólicos podem prevenir ou atrasar a progressão e manifestação clínica do câncer, posto que também são antioxidantes e anti-inflamatórios (OYENIHI; SMITH, 2019). O consumo de compostos fenólicos pode controlar a proliferação de células cancerígenas devido a sua capacidade de prevenir oxidação e proliferação. Tais compostos induzem a ação da

fase II das enzimas de detoxificação como, por exemplo, a glutathione redutase e a peroxidase; além de atuar como anti-inflamatórios e regularem o sistema imune (GONÇALVES et al., 2018; OYENIHI; SMITH, 2019).

CAPÍTULO 2

Aproveitamento integral de matérias-primas oleaginosas com solventes “verdes”: revisão e oportunidades

Resumo

As oleaginosas estão entre as plantas de maior produção mundial e são utilizadas para obtenção de óleos e gorduras para consumo humano. Nesse processo, geram-se coprodutos, ricos em compostos fenólicos com comprovados benefícios à saúde, mas geralmente destinados para a alimentação animal. A extração destes compostos fenólicos é comumente realizada por solventes orgânicos, tóxicos, inflamáveis e não biodegradáveis. Os extratos obtidos, como consequência, requererem extensa purificação para aplicação em alimentos, fármacos e cosméticos. Por este motivo, há um apelo maior para o uso de solventes e tratamentos que sigam os princípios da química “verde”, evitando a poluição ambiental e diminuindo os riscos de acidentes na manipulação de solventes tóxicos. Com estas características, vêm sendo introduzidos os solventes eutéticos profundos (DES), formados principalmente de metabólitos primários, como ácidos orgânicos, açúcares, álcoois e aminoácidos associados a sais quaternários de amônio naturais. Os DES já foram utilizados para extrair compostos bioativos de plantas, ervas e bebidas, sendo mais frequentemente empregados para a extração de compostos fenólicos e obtendo, muitas vezes, resultados melhores que os solventes comuns. Os extratos com DES também estão associados a uma maior estabilidade, devido às ligações de hidrogênio entre seus componentes, responsáveis ainda pela maior solubilidade e extração de compostos fenólicos. O objetivo desta revisão foi reunir estudos que utilizaram DES e suas variantes na extração de compostos fenólicos de matérias-primas oleaginosas, além de fazer um levantamento dos estudos sobre a estabilidade de compostos fenólicos nesses solventes sob condições de armazenamento diversas. Com isso pretendeu-se apontar as oportunidades de estudo e aplicação nessa área promissora.

Palavras-Chave: solventes eutéticos profundos, coprodutos, estabilidade

Abstract

Oilseeds are among the plants with the highest production in the world and are used for the manufacture of oils and fats for human consumption. In this process, co-products are generated, rich in phenolic compounds with proven health benefits, commonly intended for animal feeding. The extraction of these polyphenols is commonly done with organic, toxic, flammable and non-biodegradable solvents. The extracts obtained, as a consequence, require extensive purification step to apply in food, drugs and cosmetics. Consequently, there is a greater appeal for the use of solvents and treatments that focus on “green” chemistry, avoiding environmental pollution and reducing the risks of accidents when handling toxic solvents. Due to these characteristics, deep eutectic solvents (DES), which are presented here, are formed mainly of primary metabolites, such as organic acids, sugars, alcohols and amino acids associated with natural quaternary ammonium salts. DES have already been used to extract bioactive compounds from plants, herbs and beverages, and this way they are more often used for the extraction of phenolic compounds and often achieving, more frequently, better results than common solvents. DES extracts are also associated with a greater stability, due to the hydrogen bonds between their components, responsible for even greater solubility and extraction of phenolic compounds. The aim of this review was not only to collect studies that used DES and its variants in the extraction of phenolic compounds from oilseeds raw materials, in addition to surveying the studies on the stability of these solvents under different storage conditions. This was intended to point out the opportunities for study and application in this promising area.

Keywords: deep eutectic solvents, by-products, stability

1. INTRODUÇÃO

Compostos fenólicos são metabólitos secundários bioativos de plantas, que se caracterizam pelo anel aromático com a presença de ao menos um grupo hidroxila e que podem se apresentar de forma livre ou ligada a outros componentes da matriz alimentar, sendo genericamente subdivididos em: ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e estilbenos (ALU'DATT et al., 2017; SINGH et al., 2017). O consumo desses compostos, que podem ser encontrados em fontes alimentares de origem vegetal, vem sendo associado a diversos benefícios à saúde, em virtude de sua potencial ação anti-hipertensiva, anti-inflamatória, hipoglicemiante, entre outras (SINGH et al., 2017).

Oleaginosas são fontes vegetais de óleos ou gorduras como girassol, coco, palma e azeitona, por exemplo, podendo ser classificadas, em certos casos, também como leguminosas, como a soja e o amendoim (BAJAJ, 1990; ORNELAS, 2006). Oleaginosas são ainda fontes de compostos fenólicos e diversas, como azeitona, soja, girassol e canola, por ex., já tiveram sua composição de compostos fenólicos descrita (NOLLET; GUTIERREZ-URIBE, 2018). No entanto, por seu caráter predominantemente hidrofílico, os compostos fenólicos não se dissolvem eficientemente nos lipídeos extraídos, permanecendo, em grande parte, na torta ou farelo, coprodutos da extração de óleo, geralmente destinados para alimentação animal (KAREFYLLAKIS et al., 2017; NOLLET; GUTIERREZ-URIBE, 2018). Esse tipo de coproduto, além de não apresentar alto valor de mercado, ainda sofre com a redução da digestibilidade das proteínas presentes, pela ação anti-nutricional apresentada por diversos compostos fenólicos (KAREFYLLAKIS et al., 2017; PICKARDT et al., 2011). Dessa forma, a extração desses compostos do farelo ou da matéria-prima, de forma prévia à extração do óleo, não apenas aumenta o valor agregado a esses vegetais, pelo aproveitamento de compostos bioativos de interesse comercial, mas também melhora a qualidade da proteína para consumo humano ou como ração animal.

A extração de compostos fenólicos de diversas fontes vem sendo estudada detalhadamente (RENARD, 2018), no entanto, de forma geral, essa extração é alcançada pela aplicação de solventes orgânicos como metanol (ROCCHETTI et al., 2019), etanol (CALDAS et al., 2018), outros álcoois (iso-propanol, por ex.) (WEISZ; CARLE; KAMMERER, 2013) ou acetona (MOKRANI; MADANI, 2016). Esse tipo de solvente, além de inflamável e de alta volatilidade (CULL et al., 2000), ainda

apresenta toxidez e seu uso leva à poluição do meio-ambiente (CVETANOVIĆ, 2019). Os compostos fenólicos extraídos com uso desse tipo de solventes dependem de muitos passos de purificação para aplicação em alimentos, fármacos e cosméticos (CVETANOVIĆ, 2019). Em adição a isso, há uma busca por técnicas mais sustentáveis de processamento industrial, de modo a promover a preservação do ambiente (FERNÁNDEZ et al., 2018b). Uma alternativa de “solvente verde” para extração de compostos fenólicos é a aplicação de DES: solventes eutéticos profundos (da sigla em inglês: *deep eutectic solvents*) (CVJETKO BUBALO et al., 2018). O presente trabalho se propõe a revisar a literatura disponível sobre a extração de compostos fenólicos de matérias-primas oleaginosas e seus coprodutos, com a utilização de DES, de modo a identificar as muitas oportunidades de pesquisa e aplicação ainda abertas nessa área de estudo.

2. OLEAGINOSAS – PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO FENÓLICA.

Segundo o USDA (*United States Department of Agriculture*) a oleaginosa com maior produção mundial são as nozes, amêndoa, soja, azeitona, seguida da palma ou dendê e da canola e, por último, girassol e amendoim (Tabela 1) (USDA, 2020a, 2020b).

Tabela 2. 1. Produção Mundial e Brasileira de oleaginosas.

Matéria- prima	Produção mundial (milhões de toneladas)	Milhões de toneladas Maior produtor	Brasil (mil toneladas)
Nozes	2123	1000 China	-
Amêndoa	1290	998 Estados Unidos	-
Soja	336	124 Brasil	120000
Azeitona	314	201 União Europeia	-
Palma	74	44 Indonésia	-
Canola	68	19 Canadá	48
Girassol	55	17 Ucrânia	75
Amendoim	45	18 China	557

Fonte: (CONAB, 2020; FAO, 2018; USDA, 2020a, 2020b)

Todas essas oleaginosas geram torta, farelo ou bagaço¹ ou outros coprodutos após a extração do óleo pela indústria, que são destinados, na maioria dos casos, para alimentação animal (KURKI; BACHMANN; HILL, 2008), mas onde se concentram os compostos fenólicos (Tabela 2).

Tabela 2. 2. Composição de compostos fenólicos em coprodutos de oleaginosas.

Matéria Prima	Composto Fenólico	Referência
Farinha de Soja	Ácido Ferúlico Ácido Sérico Ácido Vanílico Isoflavonas	(ALU'DATT et al., 2017)
Farelo de Canola	Ácido Sináptico Taninos	(ALU'DATT et al., 2017)
Coprodutos da Azeitona	3-Glicosídeo Cianidina Apigenina Luteolina Ácido Vanílico Tirosol Hidroxitirosol Oleuropeína	(CRISOSTO; FERGUSON; NANOS, 2011; SERVILI et al., 2004)
Casca do Girassol	Ácido Clorogênico	(ALU'DATT et al., 2017)
Pele do Amendoim	Catequina Ácido clorogênico Ácido Gálico Ácido Cafeíco Ácido Coumárico	(CHANG et al., 2016)
Fruto da Palma	Ácido Cafeico Ácido Gálico Catequina 3-Glicosídeo Cianidina	(AGOSTINI-COSTA, 2018; ZHOU et al., 2019)
Casca da Amêndoa	Catequina Ácido Protocatecuico Ácido Vanílico	(ESFAHLAN; JAMEI; ESFAHLAN, 2010)
Casco de Nozes	Ácido Elágico Ácido hidroxibenzoico Ácido 3-O-cafeoilquínico	(CHANG et al., 2016; CHUDHARY et al., 2020)

As sementes das nozes (*Juglans regia* L.) possuem 65% de óleo e 15% de proteína e contém todos os aminoácidos essenciais. Dentre os compostos fenólicos mais abundantes estão os ácidos elágico, gálico, vanílico e protocatecuico

¹ Torta é denominado o produto obtido após a extração do óleo por prensagem, após este processo a torta passa por extração com solventes, gerando o farelo. Bagaço compreende os fragmentos de polpa, caroço e pele de frutos após extração do óleo.

(CHUDHARY et al., 2020; GUPTA; BEHL; PANICHAYUPAKARANAN, 2019). Nozes podem ser consumidas *in natura* e/ou na forma de farinha, em produtos de panificação e confeitaria. A casca verde do fruto (anterior ao casco) e a casca dura da noz (que protege o núcleo – noz) são moídos finamente e usados em cosméticos, na indústria para polir metais, entre outros (CHUDHARY et al., 2020). Os compostos fenólicos permanecem majoritariamente no farelo após a extração do óleo e podem precipitar as proteínas presentes, influenciando negativamente sua solubilidade e digestibilidade (KHIR; PAN, 2019). Entre os coprodutos das nozes os compostos fenólicos encontram-se, sobretudo, na casca verde, e são mais abundantes o ácido hidroxibenzoico e o pentosídeo do ácido elágico (Figura 1) (CHANG et al., 2016).

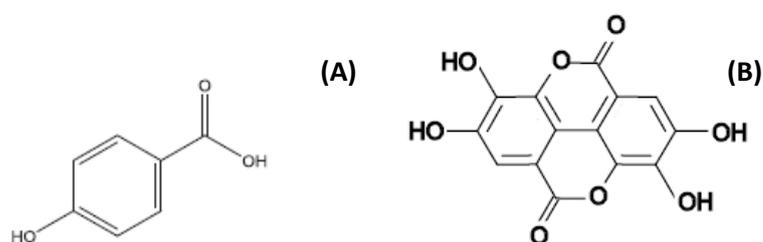


Figura 2. 1. Estrutura química do (A) ácido hidroxibenzoico e (B) ácido elágico presentes nas nozes

A amêndoa (*Prunus dulcis*), assim como as nozes, é consumida *in natura* (torrada) ou na forma de farinha (ESFAHLAN; JAMEI; ESFAHLAN, 2010). O teor de óleo na semente é de 38 a 52%, essa variação ocorre, entre as safras, devido a fatores associados ao solo, irrigação, variedade plantada, entre outros. A proteína corresponde aproximadamente a 20% da semente e é limitante em aminoácidos sulfurados - metionina e cisteína (YADA; LAPSLEY; HUANG, 2011). A torta de amêndoas, possui aproximadamente 49% de proteína e 8% de óleo residual, além dos compostos fenólicos galocatequina, ácido gálico, ácido cumárico e quercetina (KARAMAN et al., 2015). Na pele da amêndoa são encontrados 60% do total de compostos fenólicos do fruto como o ácido clorogênico, ácido sináptico, catequinas e procianidinas em maior escala em comparação às outras partes do fruto (ESFAHLAN; JAMEI; ESFAHLAN, 2010; SIRACUSA; RUBERTO, 2019). Na casca dura os principais compostos fenólicos são ácido cafeíco, cumárico e ferúlico (Figura 2) (CHANG et al., 2016).

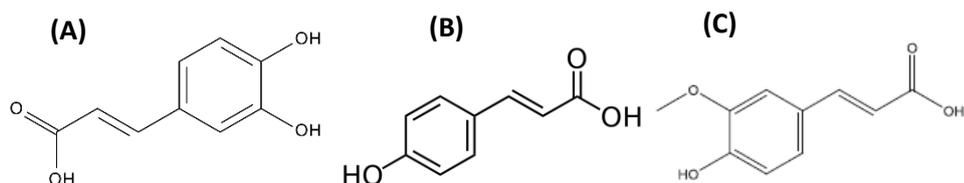


Figura 2. 2. Compostos fenólicos (A) ácido cafeíco, (B) p-cumárico e (C) ferúlico presentes na amêndoa.

O principal uso dos grãos de soja (*Glycine max*) é para a extração do óleo (18-23%), além de ser uma leguminosa com alto teor proteico (25-45%), rica em lisina e deficiente em metionina e cisteína. É amplamente cultivada, principalmente no Brasil, EUA, Argentina e China (PRATAP et al., 2016). A soja também possui alguns fatores anti-nutricionais como os inibidores de tripsina, que provocam uma menor retenção de nitrogênio em animais, e oligossacarídeos, que podem causar flatulência e diminuição da digestibilidade (ARRUTIA et al., 2020). As isoflavonas são os principais compostos fenólicos da soja. Tratam-se de fito-estrógenos com benefícios à saúde humana que aparecem, sobretudo, nas formas glicosiladas da genisteína, daidzeína, gliciteína, ononeína e sissotreína (Figura 3) (BOLCA, 2014; ORTS et al., 2019). O farelo de soja, derivado da extração do óleo, é consumido mundialmente em virtude da sua composição rica em proteínas, 98% é destinado à alimentação animal e o restante é utilizado na produção de produtos de soja para consumo humano (PRATAP et al., 2016; SINGH et al., 2017; THRANE et al., 2017).

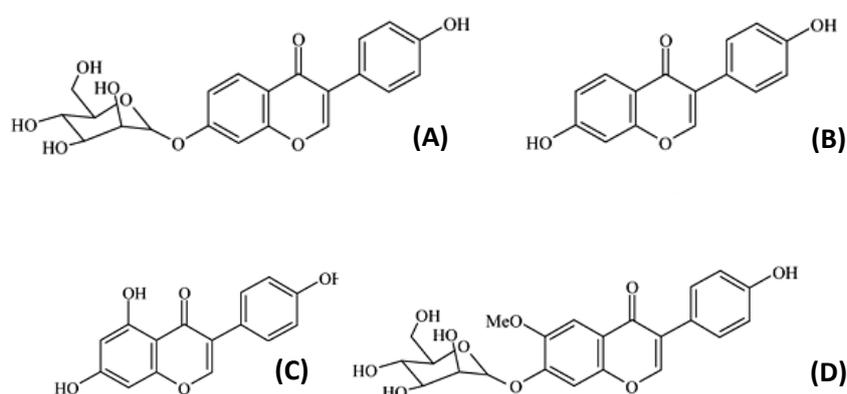


Figura 2. 3. Estruturas químicas de glicosídeos e agliconas de algumas das isoflavonas presentes na soja (A) daidzina, (B) daidzeína, (C) genisteína e (D) glicitina.

A azeitona (*Olea europaea* L.) é a matéria-prima para produção do azeite² de oliva, contém de 12 a 35% de óleo, mas em virtude da presença da oleuropeína (Figura 4), um composto fenólico que causa amargor, não pode ser consumida *in natura*. Diversos compostos fenólicos já foram identificados no azeite, e contribuem para as características sensoriais e de promoção da saúde do produto final (CRISOSTO; FERGUSON; NANOS, 2011; SERVILI et al., 2004). A azeitona gera diversos coprodutos: folhas, caroço, bagaço – correspondente à torta ou ao farelo das oleaginosas de grão - e água residual de moinho, que também são fonte compostos fenólicos, além de celulose, carboidratos, aminoácidos essenciais entre outros (RODRIGUES; PIMENTEL; OLIVEIRA, 2015). Os principais compostos fenólicos do bagaço da azeitona são oleuropeína, hidroxitirosol, ácido cafeíco, vanilina e luteolina (CHANIOTI; TZIA, 2018).

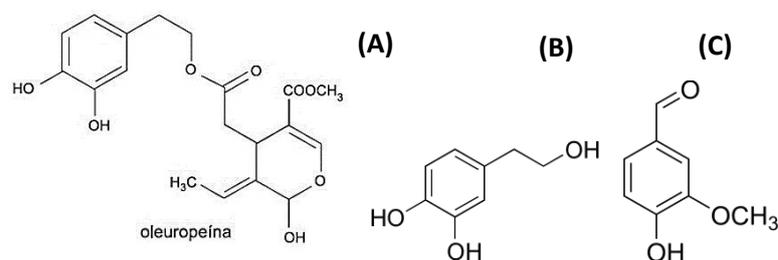


Figura 2. 4. Estruturas químicas dos principais compostos fenólicos da azeitona (A) oleuropeína, (B) hidroxitirosol, (C) ácido cafeíco e (D) vanilina.

O óleo de palma ou azeite de dendê é extraído do fruto do dendezeiro (*Elaeis guineenses*), da polpa extrai-se um óleo rico em ácido oleico e pigmentos carotenoides, da semente é extraída uma gordura rica em ácido palmítico (DO PRADO; BLOCK, 2012). Alguns dos coprodutos dessa oleaginosa são as folhas e o tronco da palmeira, o casco da semente, cachos vazios dos frutos, fibra do mesocarpo, além da água do moinho (HOSSEINI; WAHID, 2014). Isto faz com que haja uma grande geração de biomassa ligninocelulósica, ainda sem destinação econômica, na extração do óleo. Devido à alta estabilidade a temperaturas elevadas da gordura, a palma é aplicada na indústria de congelados pré-fritos como batatas fritas, por exemplo. Essa gordura é ainda utilizada como substituto da manteiga de cacau e para produzir sabonetes, detergentes, pomadas (AGOSTINI-COSTA, 2018; CHANG, 2014; DO PRADO;

² Azeite é o produto da extração do óleo de frutos. Óleos são obtidos a partir de grãos e são líquidos a temperatura ambiente. Gorduras são sólidas a temperatura ambiente.

BLOCK, 2012). O fruto da palma contém 73% de óleo, 13% de carboidratos e 3,4% de proteína, enquanto a semente da palma possui 32% de gordura (DO PRADO; BLOCK, 2012). O teor de compostos fenólicos do óleo não chega a 100 mg/L mas esses são responsáveis pela ocorrência de escurecimento durante a fritura (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014; MBA; DUMONT; NGADI, 2015). Os principais compostos fenólicos no fruto da palma são ácido hidroxibenzoico (Figura 1) e ácido ferúlico (Figura 2), mas a maior parte está na forma insolúvel ou esterificada, como parte da lignina, e os monômeros livres presentes são lixiviados e descartados na água do moinho (NEO et al., 2010). O dendê é rico em lignina (14 a 30%) que, junto com a celulose, forma uma rede que impede a extração dos demais compostos fenólicos, quando a biodisponibilidade é aumentada, por meio de lise da lignina, há um aumento do teor de ácidos hidroxibenzoico (Figura 1) e sinápico livres (Figura 5) (CHANG, 2014; ZHOU et al., 2019).

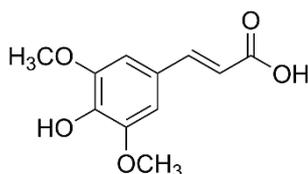


Figura 2. 5. Estrutura química do ácido sinápico presente na palma.

A canola (*Brassica napus*), assim como a soja, é rica em lipídeos e proteínas, 35 a 38% e 21 a 23%, respectivamente. As principais proteínas da canola são globulinas, solúveis em soluções salinas, e prolaminas, insolúveis em água e soluções salinas, mas solubilizáveis em soluções hidroetanólicas (WANASUNDARA et al., 2017). Os compostos fenólicos da canola permanecem no farelo e são considerados fatores anti-nutricionais, por imobilizarem minerais como cálcio, zinco, magnésio e ferro, impedindo sua absorção satisfatória. Além disso, interagem com a proteína em condições alcalinas extremas, normalmente utilizadas para solubilização proteica, gerando cor escura indesejável (ARRUTIA et al., 2020; WANASUNDARA et al., 2017). A sinapina (Figura 6), éster do ácido sinápico (Figura 5) e da colina, representa 80% dos compostos fenólicos do farelo de canola (LAGUNA et al., 2018). O farelo de canola possui aproximadamente 44% de proteína que, assim como a da soja, é destinada para uso animal e, mais recentemente, vem sendo purificada em isolados proteicos para consumo humano (BARTHET; DAUN, 2011).

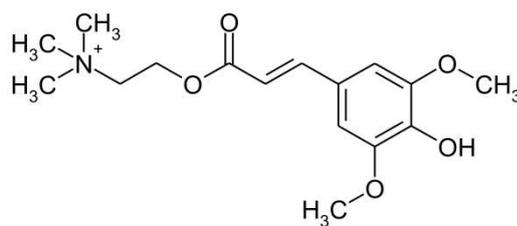


Figura 2. 6. Estrutura química da sinapina presente na canola.

A semente do girassol (*Helianthus annuus*) é rica em óleo e proteína, com aplicação na indústria alimentícia e nutracêutica. Assim como na canola, há formação de um complexo proteína-fenol irreversível em condições alcalinas, causando perdas nas propriedades sensoriais, estabilidade e vida-de-prateleira (KAREFYLLAKIS et al., 2017; ZOUMPOULAKIS et al., 2017). A semente do girassol descascada é composta de 20% proteína, basicamente globulinas e albuminas, sendo o único aminoácido limitante a lisina; e possui de 38 a 50% de óleo (DUNFORD; MARTÍNEZ; SALAS, 2015; WILDERMUTH; YOUNG; WERE, 2016). O mais abundante composto fenólico da semente de girassol é o ácido clorogênico (70%) (Figura 7), com utilização como antibacteriano, anticarcinogênico e antioxidante (AMAKURA, 2013; KAREFYLLAKIS et al., 2017). O farelo de girassol (30%), que pode ser usado com substituto da soja na alimentação animal, possui em média 32% de proteína e pode conter até 4% de compostos fenólicos na sua massa seca. A casca (25%) contém cerca de 6% de proteína e 3% de óleo e é majoritariamente composta por fibras, que representam até 60% da massa (DUNFORD; MARTÍNEZ; SALAS, 2015; GENTIL; SERRA; CASTRO, 2012; LOMASCOLO et al., 2012).

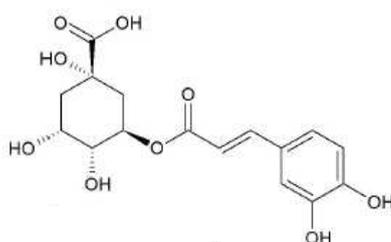


Figura 2. 7. Estrutura química do ácido 5-cafeoilquínico presente no girassol.

O amendoim (*Arachis hypogaea*) é uma leguminosa, utilizada majoritariamente para consumo humano (60%) na forma torrada ou de manteiga de amendoim, por

exemplo, enquanto o restante é destinado à produção do óleo. É um alimento com potencial alergênico e que vem sendo relacionado à possível contaminação por aflatoxina (CHANG; SREEDHARAN; SCHNEIDER, 2013; SUCHOSZEK-ŁUKANIUK et al., 2011). A semente do amendoim possui 46% de óleo e 28% de proteína, sendo as principais a araquina e a conaraquina, que apresentam alta funcionalidade de espumação (GHATAK; SEN, 2013; MÜHLBAUER; MÜLLER, 2020). Os principais compostos fenólicos do amendoim são as catequinas e os ácidos clorogênicos, encontrados na semente crua e torrada (CHANG et al., 2016). O farelo do amendoim também é destinado para alimentação animal, com teor de proteína que pode atingir até 45% (BALANDRÁN-QUINTANA et al., 2019) e os principais compostos fenólicos presentes no farelo são os ácidos cafeíco, cumárico e gálico. Na pele do amendoim os principais são os ácidos cafeíco, gálico, coumaroil-tartárico, caftárico e coutárico (Figura 8) (CHANG et al., 2016).

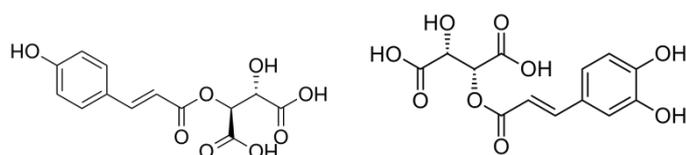


Figura 2. 8. Estrutura química dos principais compostos fenólicos do amendoim: (A) ácido coutárico e (B) ácido caftárico.

3. EXTRAÇÃO POR SOLVENTES

Diversos métodos de extração foram estabelecidos para obtenção dos compostos fenólicos da sua fonte alimentar de origem, dentre eles extração auxiliada por enzimas, por micro-ondas ou por ultrassom, entre outras (ALANÑÓN et al., 2020; FERNÁNDEZ et al., 2018b; KHEZELI; DANESHFAR; SAHRAEI, 2016). Porém, a extração mais comum é alcançada pelo contato com solventes orgânicos, por ser simples e frequente, devido à quantidade de estudos que a utilizam. São variáveis desta metodologia o tipo de solvente, a temperatura, o tempo e a relação entre amostra e solvente (NOLLET; GUTIERREZ-URIBE, 2018). Os solventes orgânicos são muito eficientes para a extração de compostos fenólicos de matrizes alimentares, mas possuem como principais desvantagens a inflamabilidade e toxicidade, além de não serem biodegradáveis, por isso alternativas mais sustentáveis vem sendo desenvolvidas para substituir estes solventes. Uma alternativa para este caso são os solventes

eutéticos profundos (RUESGAS-RAMÓN; FIGUEROA-ESPINOZA; DURAND, 2017).

3.1 SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS

Os DES foram descritos primeiramente por Andrew Abbott, a princípio como sendo uma mistura de sais de amônio quaternário e sais de íons metálicos, formando um solvente líquido em temperatura ambiente, com ponto de congelamento mais baixo. Sua capacidade de se manter no estado líquido está relacionada à formação de pontes de hidrogênio entre compostos que doam ou aceitam elétrons ou prótons (ABBOTT et al., 2003). Com a busca por uma química mais ambientalmente compatível, os DES foram classificados como “verdes”, pois são biodegradáveis, biocompatíveis e sustentáveis, que são alguns dos princípios da extração verde. Além disso, a química verde prevê que os solventes devem ser seguros, atóxicos e não inflamáveis (CVJETKO BUBALO et al., 2018; FERNÁNDEZ et al., 2018b). Os DES são a alternativa sustentável dos líquidos iônicos (IL do inglês *ionic liquids*), compostos de ânions inorgânicos ou orgânicos e cátions orgânicos e que podem ser líquidos em temperaturas próximas à ambiente. Os IL são considerados tóxicos e pouco degradáveis, mas possuem similaridades com os DES, como ponto de fusão baixo, alta viscosidade, baixa pressão de vapor, além do baixo custo (ITOH; KOO, 2019; SOCAS-RODRÍGUEZ et al., 2020). Algumas aplicações dos DES são o uso como veículo solvente em fármacos com baixa solubilidade em água, extração de compostos bioativos de produtos e coprodutos, meio para preservação de bactérias, entre outros (VANDA et al., 2018).

Devido ao apelo como solvente verde, diferentes formulações de DES vêm sendo utilizadas para extrair compostos bioativos de plantas, ervas e bebidas, sendo o mais frequente a extração de compostos fenólicos, muitas vezes obtendo resultados melhores que os obtidos com solventes comuns (SOCAS-RODRÍGUEZ et al., 2020).

Existem três formas comuns de preparar os DES, que podem sofrer modificações, os métodos: ‘*heating and stirring*’ aquecer e agitar, ‘*freeze-drying*’ liofilizar e ‘*evaporating*’ evaporar. O primeiro consiste em aquecer os componentes para formação do DES a 80°C e agitar até obtenção de um líquido homogêneo, mas pode sofrer modificações de temperatura no caso do preparo de um DES natural; a

liofilização é feita a partir de soluções aquosas dos componentes do solvente misturadas e congeladas, seguidas de liofilização para remoção da água e, assim, obter o DES; no último método, os componentes são dissolvidos em água e levados a evaporador rotatório a 50°C, para evaporação da água, até obter peso constante (DAI et al., 2015; SOCAS-RODRÍGUEZ et al., 2020).

Para obter-se um DES é necessário misturar dois ou três componentes, dos quais ao menos um deve estar no estado sólido, sendo um receptor e um doador de hidrogênio, em molaridades adequadas, que interagem gerando uma mistura eutética, ou seja, uma substância que se comporta como pura durante um processo de fusão. Os componentes dos DES possuem separadamente pontos de fusão diferentes e a interação entre si formam ligações de hidrogênio, provocando uma queda “profunda” nesta temperatura de fusão (Figura 9). Existem quatro tipos de DES, formados de sais quaternários de amônio, halogenetos metálicos hidratados ou não e doadores orgânicos de hidrogênio (Tabela 3) (CVJETKO BUBALO et al., 2018; SMITH; ABBOTT; RYDER, 2014; SOCAS-RODRÍGUEZ et al., 2020; VANDA et al., 2018).

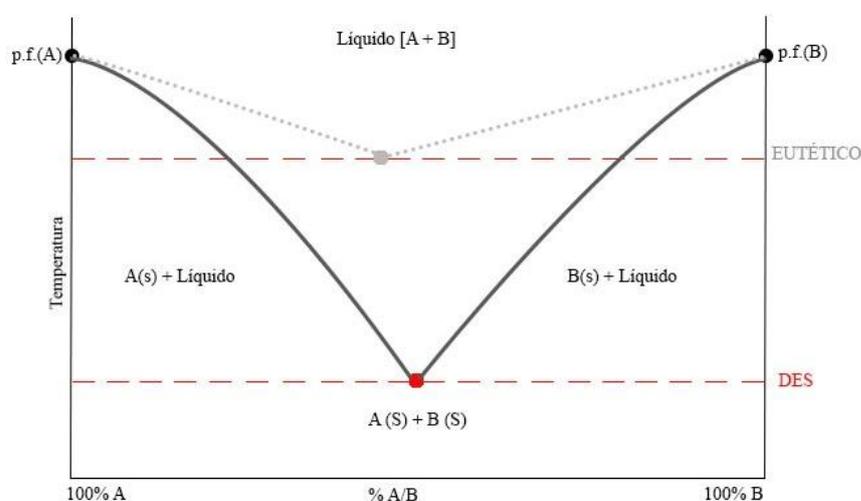


Figura 2. 9. Esquema do ponto eutético de duas substâncias sólidas (S).

Tabela 2. 3. Composição dos tipos de DES com exemplos.

DES	Componente 1	Componente 2
Tipo I	Sais quaternários Ex. ChCl	Halogenetos metálicos Ex. ZnCl ₂ ; CuCl ₂ ; LiCl ₂
Tipo II	Sais quaternários Ex. ChCl	Sais metálicos hidratados Ex. CuCl ₂ ou CrCl ₂ ou NiCl ₂ • H ₂ O;
Tipo III	Sais quaternários Ex. ChCl	Doadores de hidrogênio Ex. C ₃ H ₈ O ₃ ; C ₆ H ₁₂ O ₆ ; C ₃ H ₆ O ₃
Tipo IV	Sais metálicos Ex. ZnCl ₂	Doadores de hidrogênio Ex. CH ₄ N ₂ O; C ₂ H ₆ O ₂ ; C ₂ H ₅ NO

ChCl: Cloreto De Colina;
C₃H₈O₃: Glicerol; C₆H₁₂O₆: Glicose; C₃H₆O₃: Ácido Lático;
CH₄N₂O: Ureia; C₂H₆O₂: Etilenoglicol; C₂H₅NO: Acetamida

3.2 SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NATURAIS

Os solventes eutéticos profundos naturais (NADES da sigla em inglês de *natural deep eutectic solvents*) são uma derivação dos DES que utilizam, na sua composição, metabólitos primários como açúcares, álcoois, aminoácidos, ácidos orgânicos e sais quaternários de amônio naturais (Figura 10) como o cloreto de colina, componente do complexo B, e a betaína, um aminoácido não proteico amplamente distribuído em tecidos animais e vegetais, como aceptores e doadores de hidrogênio (CRAVEIRO et al., 2016; FERNÁNDEZ et al., 2018b; SOCAS-RODRÍGUEZ et al., 2020). A proposta dos NADES é obter um solvente alternativo, composto somente de ingredientes naturais, que acredita-se aparecerem em todas as células vivas, através da combinação de compostos presentes, como uma terceira fase líquida imiscível nas outras duas fases: água e lipídios, desenvolvendo funções de biossíntese, solubilização e armazenamento (CHOI et al., 2011; CVJETKO BUBALO et al., 2018; VANDA et al., 2018). Os NADES são preparados pelos mesmos métodos dos DES e podem ser classificados de quatro formas: derivados de ácidos orgânicos, derivados de cloreto de colina, misturas de açúcares ou outras combinações. Esperava-se que estes solventes se tornassem solventes universais, mas eles são extremamente seletivos e, por isso, cada aplicação depende do NADES mais propício (CHOI; VERPOORTE, 2019;

FERNÁNDEZ et al., 2018b). Cada solvente tem uma propriedade físico-química própria, as combinações de componentes alteram a polaridade e consequentemente, a capacidade de extração de compostos bioativos. Os solventes naturais com menor polaridade tiveram menos eficácia na extração de compostos polares e alta para não polares. Radosevic et al. (2016) mostrou que NADES à base de açúcares e outros poliálcoois tem polaridade similar à do metanol e são menos polares que os NADES à base de ácidos orgânicos (DAI et al., 2015).

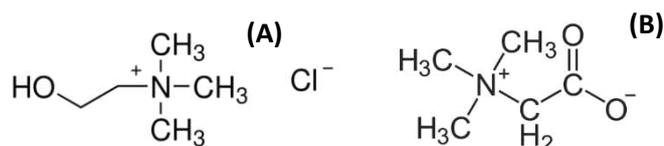


Figura 2. 10. Estrutura química do (A) cloreto de colina e da (B) betaína.

Tanto NADES como DES possuem alta viscosidade, associada à presença das ligações de hidrogênio, que reduzem a mobilidade molecular, e esta característica pode interferir no tempo que é gasto manipulando um solvente viscoso (FERNÁNDEZ et al., 2018b). Dai e colaboradores (2015) indicaram que a adição superior a 50% (v/v) de água rompe as interações de hidrogênio e desfaz a supermolécula que forma os NADES, porém, adições menores são benéficas, pois modelam o solvente para dissolução de substâncias com características diferentes. A adição de água pode ser realizada durante a preparação do solvente ou depois de pronto, entre 20 e 30% ajuda a otimizar a seletividade do NADES e ajustar a polaridade (CVJETKO BUBALO et al., 2018; FERNÁNDEZ et al., 2018b; VILKOVÁ; PŁOTKA-WASYLKA; ANDRUCH, 2020).

Os NADES, por estarem presentes em células, estão relacionados a aplicações na área da saúde, como na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia. Por isso há estudos que visam extrair compostos fenólicos de coprodutos (CHOI; VERPOORTE, 2019; CVJETKO BUBALO et al., 2018; VANDA et al., 2018). Há estudos diversos sobre o uso dos NADES/DES para extração de compostos fenólicos de sementes de café (AHMAD et al., 2018), alecrim (BARBIERI et al., 2020), casca de toranja (EL KANTAR et al., 2019), folhas de amoreira (GAO et al., 2020).

Em suma, NADES são solventes biodegradáveis de baixo custo e simples preparação, sem gerar resíduos, com grande faixa de polaridade e grande poder de

solubilização. Além disso, não são inflamáveis e tóxicos, como os solventes orgânicos. Mas há algumas desvantagens, porque tem pressão de vapor próxima a zero o que dificulta a recuperação do composto extraído permitindo, atualmente, seu uso em escala industrial apenas para obtenção de produtos que não necessitam de recuperação (CVJETKO BUBALO et al., 2018; SOCAS-RODRÍGUEZ et al., 2020)

3.3 SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS TERAPÊUTICOS

Como uma alternativa farmacêutica, se apresentaram os solventes eutéticos profundos terapêuticos (THEDES – da sigla em inglês de *therapeutic deep eutectic solvents*), que podem ser formados por um componente farmacêutico associado a um constituinte do THEDES ou o fármaco pode ser solubilizado em um DES pré-formado. THEDES são capazes de aumentar o potencial de solubilidade, penetração e absorção do ingrediente farmacêutico na mistura eutética (BARROS et al., 2017; SOCAS-RODRÍGUEZ et al., 2020). Os THEDES foram propostos pela primeira vez em um estudo que verificou o efeito de misturas eutéticas compostas de ibuprofeno e diferentes terpenos no aumento da absorção transdérmica, sugerindo que, com uso dos DES, se atinge a máxima permeação de ibuprofeno, o que foi atribuído à redução do ponto de fusão para a mesma temperatura do experimento de permeação (STOTT, 1998). As vantagens do uso dos THEDES são as altas estabilidade e solubilização de diversos compostos, inclusive os pouco solúveis em água, e o aumento da biodisponibilidade de compostos farmacêuticos (BARROS et al., 2017). Outro estudo mostrou que um DES formado de cloreto de colina:ácido ascórbico foi capaz de solubilizar dexametasona, um medicamento que, associado à vitamina C, ajuda a diferenciação de células-tronco em células osteogênicas (SILVA et al., 2018).

3.4 ESTABILIDADE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS EM DES

Apesar da recente introdução dos DES, estão disponíveis na literatura estudos que avaliaram a estabilidade dos compostos fenólicos após a extração com DES, em comparação com o uso de solventes orgânicos convencionais. A composição dos DES justifica seu potencial estabilizante, uma vez são formadas ligações de hidrogênio entre seus componentes, que além de melhorar a solubilidade e o poder de extração de

compostos fenólicos, pode também evitar sua rápida degradação (CHOI et al., 2011; DAI; VERPOORTE; CHOI, 2014).

Dai et al. (2014) avaliaram a estabilidade da cartamina, um pigmento natural do cártamo (*Carthamus tinctorius*) usado como aditivo alimentar e cosmético. A cartamina foi extraída com cinco tipos de NADES, com etanol (40%) e com água e sua estabilidade foi avaliada sob calor, por até 120 min, quanto ao armazenamento em diferentes temperaturas (-20°C, 4°C e 25°C), por 60 dias, e sob exposição à luz branca, por 15 dias. A cartamina foi mais estável ao tratamento térmico no NADES formado de xilitol:cloreto de colina em comparação com a extração aquosa, tendo a perda mais expressiva sido verificada na maior temperatura testada (80°C). A solução de NADES:cartamina foi exposta a 24 horas de luz em temperatura ambiente. Ocorreu degradação entre as amostras que ficaram cobertas e expostas à luz, mas não houve diferença para os NADES compostos de glicose:cloreto de colina, sacarose:cloreto de colina e água e a perda mais acentuada foi vista nos extratos de solvente orgânico e na água, expostas à luz. Sob congelamento, a cartamina se manteve estável por 7 dias, mas depois de 15 dias houve uma perda de aproximadamente 10% na maioria dos NADES e de 50% em água e 40% no extrato hidroetanólico. Armazenado a 4°C, o pigmento ficou estável pelo período de 30 dias no NADES composto de sacarose:cloreto de colina e sofreu degradação de 80% do extrato aquoso e 60% no hidroetanólico.

Em outro estudo, o mesmo grupo de pesquisa (DAI et al., 2016) avaliou a estabilidade da antocianina cianidina extraída com NADES de ácido láctico:glicose de pétalas de duas variedades de *Catharanthus roseus*, uma planta ornamental, ao calor, por até 120 minutos, e ao armazenamento a -20°C, 4°C e 25°C, por 90 dias. A cianidina se mostrou mais estável do que o extrato etanólico acidificado a 60°C, enquanto que a 80°C e 40°C não houve diferença entre o solvente orgânico e o NADES. O NADES formado de ácido láctico:glicose manteve a cianidina estável por 90 dias a -20°C, por 30 dias a 4°C e, em temperatura ambiente, houve degradação de 60% após o período de armazenamento. O etanol acidificado, a -20°C, apresentou curva de degradação similar ao extrato de NADES armazenado em temperatura bem superior: 4°C.

Fernández et al (2018) estudaram a estabilidade de compostos fenólicos de diferentes tipos de resíduos (bagaço de azeitona; escapas e umbelas da cebola; pele,

semente e frutos descartados de tomate e pera) ao armazenamento a -18°C, 4°C e 25°C, por 60 dias, em NADES de ácido láctico:glicose, em água e em metanol. A estabilidade de oito compostos fenólicos, presentes nos coprodutos de cebola, tomate, pera e azeitona, foi avaliada ao armazenamento, a -18 e 4°C. Todos os compostos permaneceram estáveis em solvente natural de ácido láctico:glicose e metanol por todo o período da análise e no extrato aquoso foi registrado uma perda de 90% de quercetina e apigenina, principalmente. Sob temperatura ambiente (25°C) apenas oleuropeína, quercetina, apigenina e hidroxitirosol apresentaram perdas de 30 a 50% (FERNÁNDEZ et al., 2018a).

Jeliński et al. (2019) analisaram a estabilidade da curcumina, um polifenol presente na cúrcuma (*Curcuma longa*), à luz branca, em NADES de cloreto de colina:glicerol, em metanol e na cúrcuma em pó, por de 15 a 120 minutos (JELIŃSKI; PRZYBYŁEK; CYSEWSKI, 2019). A curcumina em NADES se manteve estável por toda a análise, enquanto a extraída com metanol e a cúrcuma em pó tiveram uma perda progressiva chegando a apenas 5% de concentração de curcumina no metanol e 19% na cúrcuma em pó ao final do experimento (JELIŃSKI; PRZYBYŁEK; CYSEWSKI, 2019).

Panić et al. (2019) observaram a estabilidade de antocianinas do bagaço da uva utilizando duas combinações de NADES e extrato hidroetanólico acidificado sob armazenamento a -18°C, 4°C e 25°C, por 60 dias. Aproximadamente 70% das antocianinas do bagaço da uva foram degradadas em armazenamento à 4°C na formulação de NADES cloreto de colina:prolina:ácido málico, tendo uma redução igual ou pior ao extrato hidroetanólico acidificado, enquanto o NADES composto de cloreto de colina:ácido cítrico teve a melhor estabilidade a 4°C e -18°C (PANÍĆ et al., 2019b).

Barbieri et al (2020) utilizaram cinco combinações de NADES para extrair e investigar a estabilidade de compostos fenólicos do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) ao armazenamento, por 72h, a 25°C. A degradação dos compostos fenólicos do alecrim foi mensurada comparando a atividade antioxidante inicial e do dia de armazenagem. Após as 72h, a maior degradação ocorreu no extrato etanólico e o NADES que manteve melhor os compostos fenólicos foi o formado por cloreto de colina:ácido oxálico: (BARBIERI et al., 2020).

Como pode ser observado, os trabalhos disponíveis na literatura mostram um grande potencial para a capacidade estabilizante de DES sobre compostos fenólicos extraídos, quando em comparação com solventes convencionais. Mais avaliações devem ser realizadas, uma vez que a composição do solvente utilizado parece ter enorme influência no resultado final.

4. USO DE DES EM OLEAGINOSAS

Como anteriormente relatado, as oleaginosas são ricas fontes de compostos fenólicos e os estudos vem apontando para uma melhora no rendimento de extração desses compostos, além do aumento de sua estabilidade, pelo uso dos DES, que são ainda uma alternativa verde aos solventes orgânicos. Em uma busca, nas bases de dados disponíveis, por trabalhos que objetivaram a extração de compostos fenólicos em oleaginosas e seus coprodutos com uso de DES/NADES/THEDES, foram coletados 16 artigos, que corresponderam aos objetivos desta revisão. Destes, 9 utilizaram azeitona ou seus coprodutos, 2 de coprodutos da palma, 1 de soja, 1 de amendoim, 1 de canola, 1 de amêndoa, 1 de coproduto de nozes e 1 utilizou o coproduto de uma leguminosa não-oleaginosa, o grão-de-bico. A seguir estão apresentados os principais achados desses estudos, que também se encontram sumarizados na Tabela 4.

4.1 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE OLEAGINOSAS E SEUS COPRODUTOS COM USO DE DES

4.1.1 Folhas de noqueira

Folhas de noqueira, árvore da qual provém as nozes, foram extraídas sob aquecimento a 50°C, por 60 minutos e 600 rpm, com quinze combinações de DES usando etanol:água, etanol puro e água pura como controles. Foram quantificados o ácido 3-*O*-cafeoilquinico, glicosídeo de quercetina e pentosídeo de quercetina por UFLC (*Ultra fast liquid chromatography*). O DES composto por cloreto de colina:ácido fenilproprionico obteve melhor rendimento e o cloreto de colina:ácido láctico gerou a pior extração dos compostos fenólicos analisados (VIEIRA et al., 2018).

4.1.2 Óleo de Amêndoa

Khezeli et al. (2016) em seu estudo, analisaram a capacidade dos DES de cloreto de colina:etilenoglicol (1:2) de extrair compostos fenólicos previamente adicionados ao óleo de amêndoa. Foram adicionadas quantidades conhecidas de compostos fenólicos ao óleo de amêndoa e a melhor recuperação se deu para os ácidos ferúlico e cinâmico e a pior para o ácido cafeíco.

4.1.3 Produtos de soja

Diversos produtos de soja como farinha, grãos, macarrão, cereais matinais, bebidas de soja, entre outros, foram testados para extração de isoflavonas por dezessete tipos de NADES, com dois ou três componentes. Um experimento de otimização usou um cereal matinal com uma quantidade conhecida de isoflavonas, buscando a melhor combinação de NADES, porcentagem de água adicionada, relação NADES:amostra, tempo e temperatura de extração e potência de sonicação, e foram definidos cloreto de colina:ácido cítrico; 1:1; 30% de água; relação NADES:amostra 3:1; 60°C por 60 minutos, 616 W. Daidzeína foi a isoflavona em maior concentração nos produtos derivados da soja (BAJKACZ; ADAMEK, 2017).

4.1.4 Azeitona: produtos e coprodutos

A extração de compostos fenólicos em azeitona e seus coprodutos utilizando solventes eutéticos profundos foi a mais explorada dentre as oleaginosas. García et al (2016) utilizaram 11 combinações diferentes de DES, com dois ou três componentes cada, a fim de identificar, no azeite de oliva virgem, compostos fenólicos. As amostras foram agitadas em banho aquecido a 40°C, por 1h, utilizando água e solução metanólica como controles e os extratos obtidos foram avaliados por HPLC. Foram identificados 13 compostos no azeite de oliva virgem em praticamente todos os extratos de DES e os que tiveram maior rendimento foram os DES formados por cloreto de colina:xilitol e cloreto de colina:1,2-propanodiol enquanto o menor rendimento foi obtido com o DES composto de cloreto de colina:sacarose. Os solventes compostos por ácidos orgânicos (cloreto de colina:ácido láctico e cloreto de colina:ácido malônico) extraíram melhor fenóis simples, hidroxitirosol e tirosol. Os DES formados com álcoois (cloreto de colina:glicerol, cloreto de colina:1,4-

butanodiol; cloreto de colina:1,2-propanodiol) extraíram melhor oleacina e oleocanto e obtiveram resultados similares aos da amostra extraída com solução metanólica (GARCÍA et al., 2016). Outro estudo com azeite de oliva utilizou duas combinações de DES (cloreto de colina:etilenoglicol e cloreto de colina:glicerol) para verificar o poder de extração dos DES de compostos fenólicos adicionados ao azeite. Para a extração, a amostra foi adicionada dos ácidos ferúlico, cafeico e cinâmico e diluída em hexano (1:1) e em seguida misturada ao DES, sonicada por 5 minutos, centrifugada e a fase correspondente ao DES foi avaliada em HPLC. O DES de cloreto de colina:etilenoglicol foi mais eficiente na extração dos compostos fenólicos adicionados previamente e os compostos mais abundantes foram os ácidos cafeico e ferúlico, 100% recuperados em relação à quantidade adicionada (KHEZELI; DANESHFAR; SAHRAEI, 2016). Em 2019, Paradiso et al. investigaram a concentração de compostos fenólicos do azeite de oliva extra virgem usando NADES de ácido láctico:glicose:água, extraído a amostra com hexano e NADES por agitação em vórtex. O teor de compostos fenólicos foi quantificado por método de Folin-Ciocalteu e o perfil de compostos extraído foi identificado por análise em HPLC. No azeite de oliva extra virgem as melhores extrações obtiveram derivados do hidroxitirosol e tirosol, utilizando NADES composto de um ácido orgânico (ácido láctico:glicose:água) (PARADISO et al., 2019), de modo similar ao obtido por García et al. (2019) no mesmo tipo de amostra. Shabani et al (2020) também utilizaram DES composto de ácido láctico:glicose:água (6:1:6) sobre azeite de oliva extra virgem, mas realizaram uma otimização da extração dos compostos fenólicos totais variando temperatura, tempo de sonicação, tempo e velocidade de centrifugação e relação DES/amostra. A quantificação foi alcançada por método eletroquímico. Os melhores resultados foram obtidos com relação DES:amostra de 1:2, 10 minutos de sonicação e centrifugação a 9000 rpm por 10 min em temperatura ambiente (SHABANI et al., 2020). Em comparação entre o método espectrofotométrico realizado por Paradiso et al. (2016), o método proposto por Shabani et al (2020) obteve resultados similares na determinação dos ácidos cafeico e vanílico.

Os compostos fenólicos do bagaço da azeitona, coproduto gerado após a extração do óleo, foram extraídos por diferentes métodos (homogeneizador de alta velocidade, micro-ondas, ultrassom e pressão hidrostática) com quatro tipos de NADES de cloreto de colina associado a maltose, glicerol, ácido cítrico e ácido láctico (CHANIOTI; TZIA, 2018). Na extração por micro-ondas e pressão hidrostática, o

melhor NADES foi cloreto de colina:ácido láctico e utilizando ultrassom e homogeneização, o melhor NADES foi composto com ácido cítrico, em todas as extrações houve melhor rendimento de oleuropeína e quando aplicadas temperaturas mais altas, a extração com NADES de hidroxitirosol e rutina melhorou em relação aos solventes controle (álcool e água). Foi definido como o melhor método a homogeneização para os NADES de ácido láctico, ácido cítrico e glicerol, que extraíram as maiores quantidades de oleuropeína, sem diferença significativa entre os NADES (CHANIOTI; TZIA, 2018). Fernández-Prior et al. (2020) testaram, em experimentos de otimização, para extração de compostos fenólicos do bagaço de azeitona: dez formulações de DES, temperatura, tempo e relação DES:amostra. Dos dez tipos de NADES testados, se destacou o formado de cloreto de colina:ácido glicólico:ácido oxálico que obteve melhor extração em banho termostático a 120°C, com relação de 1:1 de NADES:bagaço de azeitona (FERNÁNDEZ-PRIOR et al., 2020).

Outro coproduto da produção de azeitonas são as folhas da oliveira, que representam até 10% da massa das azeitonas colhidas, que chegam ao moinho. Alañón et al. (2020) extraíram das folhas da oliveira compostos fenólicos com nove combinações de DES auxiliado por aquecimento em micro-ondas, por 20 minutos, a 65°C, e usando solução hidrometanólica como controle. Um total de 48 compostos foram identificados por HPLC, dentre eles oleuropeína, ácido elenólico e glicosídeo de luteolina. O melhor DES testado foi o de cloreto de colina:etilenoglicol e os piores cloreto de colina:ácido tartárico e cloreto de colina:ácido oxálico, coincidentemente os dois solventes com as maiores viscosidades. Após otimização, o estudo concluiu que as melhores condições de extração para o DES de cloreto de colina:etilenoglicol foram 79,6°C, 43,3% de água adicionada e aquecimento em micro-ondas por 16,7 min. Também usando folhas de oliveira como matéria-prima, Kaltsa et al. (2020) utilizaram DES formado por glicina:ácido láctico, em diferentes proporções, em banho de óleo a 50°C, sob agitação magnética a 500 rpm, por 150 minutos. A melhor relação molar entre os componentes do DES foi 5:1, que obteve melhor rendimento de extração do que os controles: metanol, etanol e água. Dentre os compostos fenólicos identificados pelo estudo em maior quantidade estava o hidroxitirosol, seguido de oleuropeína e glicosídeo de luteolina (KAL TSA et al., 2020), em acordo com o encontrado por Alañón et al (2020). Um último estudo, com folhas de oliveira, testou oito preparações de NADES na extração de hidroxitirosol, extraído em banho ultrassônico a 35°C por

24h, com água e etanol:água como controle. Quatro formulações se mostraram melhores do que os solventes convencionais na extração do polifenol, sendo o NADES composto de ácido cítrico:glicina:água (2:1:1) o que alcançou a maior eficiência de extração (ZUROB et al., 2020).

4.1.5 Coprodutos da palma

Fu et al. (2017) avaliaram a possibilidade do uso de DES como uma forma verde de extrair compostos fenólicos da casca seca da palma, para isto utilizaram oito combinações de DES usando o cloreto de colina como receptor de hidrogênio e etilenoglicol, glicerol, xilitol, fenol e os ácidos fórmico, cítrico, oxálico e malônico como doadores de hidrogênio. A amostra e o DES passaram por extração em banho térmico a 40°C por 6h e foram avaliadas por HPLC. Os DES com ácidos orgânicos na sua composição alcançaram melhores resultados e dentre estes o cloreto de colina:ácido fórmico se mostrou o mais eficiente e atingiu maiores valores de ácido protocatecuico, epicatequina, catequinas e ácido cafeico, em ordem decrescente (FU et al., 2017).

Tan et al (2018) utilizou outro coproduto da palma, cachos vazios dos frutos, para extrair lignina com seis tipos de DES com pH ácido, básico e neutro, extraíndo em banho de óleo, a 120°C, por 8h. Os DES de cloreto de colina:ácido láctico e glicose:ácido láctico obtiveram melhor dissolução da lignina, em comparação a outras composições, mostrando que DES formados por ácidos orgânicos apresentaram melhor afinidade pela biomassa de palma (TAN; NGOH; CHUA, 2018).

4.1.6 Farelo de Canola

Wongsirichot et al. (2019) aplicaram três diferentes proporções molares de cloreto de colina com glicose, glicerol e etilenoglicol, gerando nove combinações de NADES para extração de ácido sinápico do farelo de canola, usando metanol como controle. As amostras passaram por aquecimento a 40, 50 e 60°C, por 2 horas sob agitação a 1000 rpm. O aumento da temperatura elevou a concentração de ácido sinápico nos NADES, mas não interferiu na extração com o solvente orgânico; a relação molar dos componentes não interferiu no rendimento final do polifenol em questão. O melhor NADES foi o que continha glicerol (WONGSIRICHOT; GONZALEZ-MIQUEL; WINTERBURN, 2019).

4.1.7 Casca de amendoim

Flavonoides da casca do amendoim foram extraídos através de combinações de líquidos iônicos, usando imidazol como aceptor de hidrogênio e ácidos orgânicos como doadores de hidrogênio. As amostras foram submetidas a extração por micro-ondas por 10 minutos a 333K (59,85°C) e quantificado por HPLC. O melhor solvente foi o composto de imidazol:ácido láctico, após uma otimização foram definidos as seguintes condições: 8 minutos de extração, a 323 K (49,85°C) (BALARAMAN; SIVASUBRAMANIYAM; RATHNASAMY, 2020).

4.1.8 Brotos de grão de bico

Shang et al. (2019) propuseram extrair isoflavonas dos brotos de grão-de-bico através da aplicação de ultrassom a 25kHz, 100 W, por 20 minutos, usando vinte combinações de DES. Foram quantificadas ononina, sissotrina, formononetina e biocanina-A. Este estudo testou como aceptores de hidrogênio o cloreto de colina, a betaína e a prolina, e as quatro isoflavonas obtiveram maiores rendimentos de extração com uso de cloreto de colina, em combinação com propilenoglicol e etilenoglicol (SHANG et al., 2019)

Tabela 2. 4. Resumo da literatura disponível sobre extração de compostos fenólicos de oleaginosas com uso de DES/NADES/THEDES

Matéria-prima	Composto Alvo	Composição DES	RM ¹	Método de Extração	Quantificação/Determinação	Resultados	Referência
Folhas de oliveira	Compostos fenólicos	Cloreto de colina:Ácido láctico	1:2	MAE ² por 20 min a 65°C (escolher o melhor DES)	Folin-Ciocalteu – Quantificação	Melhor DES – CC:Etg Pior DES – CC:AT Otimização do MAE com o melhor DES – 79,6°C, 43,3% de água, 16,7 min	(ALAÑÓN et al., 2020)
		Cloreto de colina:Ácido oxálico	1:1				
		Cloreto de colina:Ácido tartárico	2:1				
		Cloreto de colina:1,4-Butanodiol	1:6		HPLC-DAD-ESI-TOF-MS - Determinação		
		Cloreto de colina:Etilenoglicol	1:2				
		Cloreto de colina:Xilitol	2:1				
		Cloreto de colina:1,2-Propanodiol	1:1				
		Cloreto de colina:Maltose	3:1				
		Cloreto de colina:Ureia	1:2				
Metanol:água	8:2						
Produtos de soja	Isoflavonas	17 combinações de NADES		Otimização de UAE ³	UHPLC-UV	Melhor NADES – CC:AC 1:1 30% de água 60°C, 60 min	(BAJKACZ; ADAMEK, 2017)
Casca de amendoim	Flavonoides (Quercitina)	Imidazol:Ácido láctico		MAE-LLME ⁴ , 10 min a 60°C	RP-HPLC - Quantificação	Melhor pDES – I:L Otimização – 8 min a 50°C	(BALARAMAN; SIVASUBRAMA NIYAM; RATHNASAMY, 2020)
		Imidazol:Ácido cítrico					
		Imidazol:Ácido málico			NMR - Determinação	Maior degradação – I:C 89,6% em 30 dias	
		Imidazol:Ácido oxálico					
Bagaço de azeitona virgem	Compostos fenólicos	Cloreto de colina:Ácido cítrico	1:2	HAE ⁵ (homogenato) MAE UAE (banho) HHPAT ⁶ (alta pressão hidrostática)	Folin-Ciocalteu e HPLC - Quantificação	HAE foi o mais eficiente Melhores DES - CC:AL e CC:AC	(CHANIOTI; TZIA, 2018)
		Cloreto de colina:Ácido láctico					
		Cloreto de colina:Maltose					
		Cloreto de colina:Glicerol					
Orujo - azeitona	Compostos fenólicos	Cloreto de Colina:Glicerol	1:2	Tratamento térmico até 90°C	Folin Ciocalteu – Quantificação	Melhor DES até 90°C – 5, 6 e 9 Até 180°C – CC:BT e	(FERNÁNDEZ-PRIOR et al., 2020)
		Cloreto de Colina:Xilitol	2:1				
		Cloreto de Colina:Sacarose	1:1				

		Betaína:Sacarose	2:1	Os dois	HPLC -	CC:AG:AO	
		Cloreto de Colina:Ácido malônico	1:1	melhores	Identificação		
		Betaína:Ácido levulínico	1:2	solventes –			
		Cloreto de Colina:1,4-Butanodiol	1:5	vapor a 180°C			
		Cloreto de Colina:1,2-Propanodiol	1:1	Otimização do			
		Cloreto de Colina:Ácido glicólico:Ácido oxálico	1:1,7 :0,3	melhor solvente			
		Cloreto de Colina:Etilenoglicol	1:2				
Casca de palma	Compostos fenólicos	Cloreto de Colina:Etilenoglicol	1:1	Extração por refluxo a 40°C por 6h	HPLC-MS	Melhores DES CC:AF, CC:AC, CC:AO e CC:AM	(FU et al., 2017)
		Cloreto de Colina:Glicerol	1:1				
		Cloreto de Colina:Xilitol	1:1				
		Cloreto de Colina:Fenol	5 cb				
		Cloreto de Colina:Ácido Fórmico	1:1				
		Cloreto de Colina:Ácido cítrico	1:1				
		Cloreto de Colina:Ácido oxálico	1:1				
		Cloreto de Colina:Ácido malônico	1:1				
Azeite de oliva virgem	Compostos fenólicos	Cloreto de Colina:Glicerol	1:2	Agitação em banho térmico a 40°C, 60 min	HPLC-DAD - Quantificação	Melhor DES CC:X Pior DES CC:S (4:1), pior que metanol 80%	(GARCÍA et al., 2016)
		Cloreto de Colina:Ácido láctico	1:2				
		Cloreto de Colina:Urea	1:2				
		Cloreto de Colina:Sacarose	1:1				
		Cloreto de Colina:Sacarose	4:1				
		Cloreto de Colina:1,4-Butanodiol	1:5				
		Cloreto de Colina:Xilitol	2:1				
		Cloreto de Colina:1,2-Propanodiol	1:1				
		Cloreto de Colina:Ácido malônico	1:1				
		Cloreto de Colina:Urea:Glicerol	1:1:1				
		Frutose:Glicose: Sacarose	1:1:1				
Folhas de oliveira	Compostos fenólicos	Glicina:Ácido láctico	5:1	Banho de óleo, 500 rpm, 50°C, 150 min	Folin Ciocalteu - Determinação	Melhor DES a 5:1, mais que a etanol e metanol 60%, o dobro da água. Melhor a 80°C	(KAL TSA et al., 2020)
			7:1				
			9:1				
			11:1				
			13:1				
Óleo de	Ácidos	Cloreto de colina:Etilenoglicol	1:2	UAE (banho	HPLC	DES1 melhor que o DES	(KHEZELI;

amêndoa, gergelim, canela e oliva	ferúlico, cafeico e cinâmico	Cloreto de colina:Glicerol	1:2	ultrassônico) por 5 min		2	DANESHFAR; SAHRAEI, 2016)
Azeite de oliva extra virgem	Compostos fenólicos	Ácido lático:Glicose:Água	6:1:6	Agitação em vórtex	Folin Ciocalteau – Determinação	DES foi capaz de extrair CFT dos óleos, similar ao Folin	(PARADISO et al., 2016)
Azeite de oliva extra virgem	Compostos fenólicos	Ácido lático:Glicose:Água	3:1:3	Agitação em vórtex	UV-VIS e HPLC	NADES foi capaz de extrair hidroxitirosol e derivados do tirosol do azeite	(PARADISO et al., 2019)
Azeite de oliva extra virgem	Ácido gálico Ácido vanílico	Ácido lático:Glicose:Água	6:1:6	UAE otimização temperatura, tempo de sonicação, centrifugação (tempo e velocidade), DES:amostra	GC/MWCNT/TiO2	Otimização: 1:2 DES:amostra; 10 min UAE, sem aquecimento; 12000 rpm; 5 min	(SHABANI et al., 2020)
Broto de grão de bico	Isoflavonas	20 combinações de Cloreto de colina com frutose, etilenoglicol, propilenoglicol, glicerol, 1,4-butanodiol, ácido málico, ácido lático, maloato, ureia, ácido málico e xilitol, ácido málico e prolina, ureia e propilenoglicol; betaina com glicerol, ácido cítrico, ácido málico, ácido málico e glicose; prolina com glicose, ácido málico, sacarose, glicerol.		UAE, 20 min 100W	UPLC-TSQ - Quantificação	Melhor DES – CC:PPG 1:1 Pior DES – B:AM:G Otimização: 33% água, 35 min, 59°C	(SHANG et al., 2019)
Cachos de	Lignina	Cloreto de colina:Ácido lático	1:5	Incubado em	Protocolo NREL ⁸	Melhor DES – CC:AL	(TAN; NGOH;

frutos de palma vazios		Glicose:Ácido lático	1:5	banho de óleo a 120°C por 8h			CHUA, 2018)
		Cloreto de colina:Glicose	1:1				
		Cloreto de colina:Glicerol	1:2				
		Cloreto de colina:Urea	1:2				
		Carbonato de potássio:Glicerol	1:6				
Folhas de nogueira	Compostos fenólicos	Cloreto de colina:Ácido acético	1:2	HAE ⁷ por 60 min, 50°C 600 rpm	UFLC - Quantificação	Melhor DES – CC:AB Otimização: 180 min, 30°C, 53% de água	(VIEIRA et al., 2018)
		Cloreto de colina:Ácido propionico	1:2				
		Cloreto de colina:Ácido butirico	1:2				
		Cloreto de colina:Ácido valérico	1:2				
		Cloreto de colina:Ácido glicolítico	1:2				
		Cloreto de colina:Ácido lático	1:2				
		Cloreto de colina:Ácido fenilacético	1:2				
		Cloreto de colina:Ácido 3-fenilpropionico	1:2				
		Cloreto de colina:Ácido málico	1:1				
		Cloreto de colina:Ácido malônico	1:1				
		Cloreto de colina:ácido glutarico	1:1				
Farelo de canola	Ácido sinápico	Cloreto de colina:Glicose	1:1	Extração a 1000rpm por 2h em 40, 50 e 60°C	Folin-Ciocalteau – Quantificação	Melhor DES – CC:GI 1:1	(WONGSIRICHOT; GONZALEZ-MIQUEL; WINTERBURN, 2019)
		Cloreto de colina:Glicose	1,5:1				
		Cloreto de colina:Glicose	2:1				
		Cloreto de colina:Glicerol	1:2				
		Cloreto de colina:Glicerol	1:1,5				
		Cloreto de colina:Glicerol	1:1				
		Cloreto de colina:Etilenoglicol	1:3				
		Cloreto de colina:Etilenoglicol	1:2				
Folha de oliveira	Hidroxitirosol	Cloreto de colina:Frutose	1:1	UAE (banho ultrassônico) a 35°C por 24h	HPLC-UV - Quantificação	Melhor NADES – AC:G e AC:Gli O dobro do Etanol 50% Melhor proporção amostra:NADES – 1:4	(ZUROB et al., 2020)
		Cloreto de colina:Frutose	1:2				
		Cloreto de colina:Ácido cítrico	1:1				
		Cloreto de colina:Ácido lático	1:2				
		Cloreto de colina:Glicose	1:1				
		Cloreto de colina:Ácido cítrico	2:1				

Ácido láctico:Glicose	5:1
Ácido cítrico:Glicina	2:1

¹Relação Molar

²Extração assistida por micro-ondas (Microwave assisted extraction)

³Extração assistida por ultrassom (Ultrasound assisted extraction)

⁴Microextração líquido-líquido assistida por micro-ondas (Microwave-assisted liquid-liquid microextraction)

⁵Extração assistida por homogeneização (Homogenate assisted extraction)

⁶Extração assistida por alta pressão hidrostática (High hydrostatic pressure assisted extraction)

⁷Extração assistida por calor (Heat assisted extraction)

⁸American National Renewable Energy Laboratory – Protocolo de remoção de extrativos

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A crescente preocupação ambiental, social e econômica atribuída ao desperdício de alimentos, tem levado governos, academia e o público em geral a reconhecer que esse é um assunto urgente a ser abordado (SCHANES; DOBERNIG; GÖZET, 2018). A indústria de alimentos inclui muitos processos complexos que produzem um grande número de coprodutos (GARCIA-GARCIA; STONE; RAHIMIFARD, 2019). Na indústria de óleo vegetal, aproximadamente 10 a 30% do total de matéria-prima usada para produzir óleo se torna coproduto ou desperdício, levando a problemas econômicos e ambientais (KARAMAN et al., 2015). Uma alternativa interessante é a recuperação de constituintes nutricionais e/ou bioativos dos resíduos alimentares, que apresentam uma ampla gama de potenciais aplicações comerciais (GARCIA-GARCIA; STONE; RAHIMIFARD, 2019; KARAMAN et al., 2015), o que contribui para o aproveitamento integral dos recursos agrícolas. Entre os principais componentes bioativos de oleaginosas estão os compostos fenólicos (GAN et al., 2017; SINGH et al., 2017), no entanto, sua extração por solventes orgânicos convencionais, embora eficiente, traz uma série de problemas de cunho ambiental e de aplicação nas indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos (CVETANOVIĆ, 2019). O presente trabalho objetivou levantar e discutir a utilização de solventes alternativos, os solventes eutéticos profundos, em concordância com os preceitos da “química verde”, na extração de compostos fenólicos de matérias-primas oleaginosas, seus produtos e coprodutos. Os resultados disponíveis na literatura são extremamente promissores, não apenas com relação à eficiência de extração, mas também na extensão da estabilidade dos compostos extraídos. No entanto, muito ainda precisa ser avaliado para uma melhor compreensão do efeito da composição dos DES sobre a extração e a estabilidade dos diferentes compostos fenólicos e para destinação e aplicação econômica dos extratos obtidos.

CAPÍTULO 3

Solventes Eutéticos Profundos Naturais na extração e estabilidade dos compostos fenólicos de coproduto de girassol

Resumo

O farelo de girassol, principal coproduto gerado a partir da extração do óleo desta semente, é normalmente destinado à alimentação animal, mesmo rico em compostos fenólicos, onde 70% são representados pela família do ácido clorogênico. Tradicionalmente, solventes orgânicos são utilizados para extração de compostos fenólicos, mas há uma busca por solventes mais sustentáveis a fim de evitar etapas de purificação dos extratos. Os solventes eutéticos profundos naturais (NADES) já se mostraram como uma alternativa biodegradável e mais eficiente, podendo ainda melhorar a estabilidade dos compostos fenólicos nos extratos. O objetivo deste trabalho foi a obtenção de extratos fenólicos utilizando diferentes formulações de NADES e a avaliação da estabilidade dos compostos fenólicos nesses. Foram preparadas oito combinações de NADES para extração dos compostos fenólicos do farelo de girassol e os dois melhores solventes passaram por estudo da estabilidade ao calor em 40°, 60° e 80°C de 0 a 120 minutos, à luz branca durante 15 dias, e ao armazenamento à 25 ± 4°C; 8 ± 4°C e -18 ± 3°C por um período de 60 dias, utilizando extrato obtido com etanol (40%) como controle. Os melhores resultados foram obtidos pela combinação de ácido láctico:glicose (5:1) e cloreto de colina:glicerol (1:1), com 95,54 e 60,39 mg de ácido clorogênico/L, respectivamente. Embora o teor de ácido clorogênico nos extratos tenha variado significativamente com o método de quantificação utilizado, essas duas formulações foram sempre mais eficientes entre os NADES testados. Foi possível observar que o NADES formado por ácido orgânico foi o que promoveu maior estabilidade ao calor, enquanto que o composto por cloreto de colina:glicerol foi o que teve a estabilidade à luz branca melhor observada pela menor atividade água. Todos os extratos apresentaram perda significativa após 7 dias de armazenamento, nas temperaturas avaliadas. Novos ensaios estão previstos para melhor esclarecer o efeito da composição do solvente sobre a estabilidade dos compostos fenólicos do farelo de girassol nos extratos. Até o presente momento, não foram encontrados estudos que utilizaram NADES na extração de compostos fenólicos do farelo desengordurado de girassol e a estabilidade em diferentes condições de armazenamento.

Palavras chave: NADES, farelo de girassol, ácido clorogênico, ultrassom

Abstract

Sunflower meal, the main by-product generated from the extraction of the oil from this seed, is normally destined for animal feeding, although it is a raw material rich in bioactive compounds, such as phenolic compounds, in which 70% of these are represented by the chlorogenic acid family. Traditionally, organic solvents are used to extract polyphenols, but there is a search for more sustainable solvents to avoid purification stages for the application of extracts obtained in the food, cosmetics, and pharmaceutical industries. Natural deep eutectic solvents (NADES) have already demonstrated to be a more biodegradable and efficient alternative, and they can also improve the stability of phenolic compounds in extracts. The objective of this work was to obtain phenolic extracts using different formulations of NADES and evaluate the stability of phenolic compounds in these extracts under different forms of storage. Seven NADES combinations for the extraction of phenolic compounds from sunflower meal were prepared and the two best solvents underwent stability examination, such as heat, light, refrigeration, freezing and storage at room temperature, using the extract obtained with ethanol (40%) as the control. The best results were obtained by the combination of lactic acid:glucose (5:1) and choline chloride:glycerol (1:1) with 95.54 mg of chlorogenic acid/L and 60.39 mg of chlorogenic acid/L, respectively. Although the chlorogenic acid portion in the extracts varied significantly according to the quantification method used, these two formulations were always more efficient among the NADES tested. Difficulties to store portions of highly viscous extracts and the possible occurrence of solvent evaporation throughout the analysis made the results inconclusive, however, it was possible to observe that the NADES formed by lactic acid:glucose was the one that promoted greater stability to heat, while choline chloride:glycerol was the one that increased white light stability even more. All extracts showed significant loss after 7 days of storage at the temperatures evaluated. New tests are planned to better clarify the effect of the solvent composition on the stability of the phenolic compounds of sunflower meal in the extracts.

Keywords: NADES, sunflower meal, chlorogenic acid, ultrasound

1. INTRODUÇÃO

A semente de girassol é a oleaginosa com a terceira maior produção mundial, com 50,55 milhões de toneladas por ano e os maiores produtores são Ucrânia (29,7%), Rússia (25,1%) e União Europeia (18,8%) (USDA, 2020a). A principal finalidade desta semente é a produção de óleo para consumo humano, porém 30% da semente é farelo, um coproduto da extração do óleo de girassol, utilizado principalmente na alimentação animal, que possui alto teor proteico (DUNFORD; MARTÍNEZ; SALAS, 2015; GENTIL; SERRA; CASTRO, 2012). Considerando a produção mundial, são gerados, por ano, cerca de 15,16 milhões de toneladas de farelo de girassol. Este coproduto é rico em compostos fenólicos, principalmente os pertencentes à família do ácido clorogênico (CGA), que representam 70% da quantidade de compostos fenólicos da massa seca do farelo (KAREFYLLAKIS et al., 2017).

Alguns das características para obtenção de produtos que denominados como química “verde” são produtos atóxicos, não inflamáveis e/ou explosivos, biodegradáveis, não poluentes, possibilidade de reuso ou reciclagem, entre outros (CVJETKO BUBALO et al., 2018). Com a crescente busca por este tipo de química, os solventes eutéticos profundos naturais (NADES) surgiram como uma alternativa aos solventes orgânicos. Os NADES são formados pela mistura de, ao menos, dois componentes, um doador e um receptor de hidrogênio que, quando misturados em condições ideais, formam uma mistura eutética, líquida em temperatura ambiente (SOCAS-RODRÍGUEZ et al., 2020). Esses solventes não são tóxicos, inflamáveis ou voláteis como os solventes orgânicos, características que estão entre as principais vantagens de seu uso. Mas, além disso, NADES vêm sendo utilizados para extração de compostos fenólicos devido a suas propriedades físicas – viscosidade e polaridade que, quando otimizadas, apresentam maior eficiência em relação aos solventes orgânicos e à água (PAIVA et al., 2014).

A extração de compostos fenólicos vem sendo estudada com a aplicação de diferentes técnicas. Em algumas matérias-primas são utilizados métodos de longa duração, como extração por agitação mecânica ou Soxhlet, usando solventes orgânicos como etanol e metanol (TUNCHAIYAPHUM; ESHTIAGHI; YOSWATHANA, 2013; KARAMI et al., 2014). Porém, estes métodos podem levar à hidrólise e oxidação dos compostos fenólicos devido ao risco de degradação térmica da maioria dos fito-constituintes (WANG; WELLER, 2006). Métodos de extração auxiliada por ultrassom (ZARDO et al., 2017) ou micro-ondas (CALDAS et al., 2018) vêm sendo estudados como alternativa de obtenção de extratos em

menor tempo, com melhor rendimento, qualidade e pureza, principalmente em frutas e seus coprodutos. O uso do ultrassom consiste na implosão de bolhas no meio líquido, gerando uma compressão adiabática de gases e vapores dentro das bolhas, aumentando a temperatura e a pressão e favorecendo a inserção do solvente na matriz da amostra (CALDAS et al., 2018). A sonicação é um método acessível e simples, que pode ser utilizado para melhorar a eficiência da extração, aumentando a superfície de contato entre as fases e o transporte de compostos bioativos para a fase líquida (ZARDO et al., 2017).

A estabilidade dos compostos fenólicos depende da temperatura e do tempo de armazenamento, além da forma que a matéria-prima foi obtida e armazenada (CHENG et al., 2017). Alguns trabalhos avaliaram a estabilidade dos compostos fenólicos utilizando NADES como solvente da extração de *Catharanthus roseus*, uma planta ornamental (DAI et al., 2016), cúrcuma (JELIŃSKI; PRZYBYŁEK; CYSEWSKI, 2019) e cártamo (DAI; VERPOORTE; CHOI, 2014), em comparação com solventes orgânicos convencionais ou água. Os extratos que utilizaram NADES como solvente tiveram maior estabilidade devido as fortes ligações de hidrogênio entre os solutos e o solvente. A viscosidade alta destes solventes também ajuda a estabilizar as interações moleculares (DAI; VERPOORTE; CHOI, 2014).

O objetivo deste trabalho foi investigar a extração de compostos fenólicos do farelo dessolventizado de girassol utilizando formulações diversas de NADES e UAE. As formulações mais eficientes foram utilizadas na avaliação da estabilidade do extrato, ao longo do tempo (em diferentes temperaturas de armazenamento), à exposição ao calor e à luz.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

O farelo de girassol utilizado neste trabalho foi cedido pela Empresa Caramuru, situada no município de Itumbiara – GO, Brasil. O material foi enviado seco, desengordurado, dessolventizado e peletizado. A matéria-prima foi armazenada em geladeira até o momento do uso.

2.2 PREPARAÇÃO DOS SOLVENTES

Foram utilizados cloreto de colina, ácido láctico, ácido cítrico, glicose, glicerol e sacarose, de grau analítico (P.A.), em diferentes proporções e combinações, para o preparo

dos solventes, segundo a Tabela 1. Como solução de extração controle foi utilizada solução hidroetanólica a 40 %, conforme Zardo et al. (2017).

Os componentes foram pesados e levados para agitação magnética a 50°C, até que um líquido transparente e homogêneo se formasse. Os solventes foram adicionados de água ultra-pura na proporção de 30% (m/m) (RADOŠEVIĆ et al., 2016).

Tabela 3. 1. Combinações dos NADES preparados e relação molar

Sigla	Componentes do NADES		Relação molar
AC:S	Ácido cítrico	Sacarose	1:1
AC:G	Ácido cítrico	Glicose	2:1
AL:G	Ácido láctico	Glicose	5:1
CC:G	Cloreto de colina	Glicose	1:1
CC:GL	Cloreto de colina	Glicerol	1:1
CC:AC	Cloreto de colina	Ácido cítrico	1:1
CC:AL	Cloreto de colina	Ácido láctico	1:1
Et	Etanol	Água	40%*

*(v/v)

2.3 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Foram pesados 10 g da amostra vegetal e adicionado em 100 mL de etanol 40% e 4,5 g da amostra em 15 mL de NADES. Todas as amostras foram aquecidas sob agitação magnética até a temperatura de 45°C e, em seguida, foram sonicadas em ultrassom de probe (Ecosonics, QR500, Indaiatuba, Brasil) por 1 minuto, em potência de 500 W/cm² e frequência ultrassônica de 20 kHz, segundo Zardo et al. (2017). Após a extração, os extratos foram filtrados em filtro de poliéster para eliminação das partículas sólidas e armazenados a -80°C, em ultra-freezer (Indrel Scientific, IULT 335D, Londrina, Brasil), até o momento das análises.

2.4 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

O conteúdo fenólico total (CFT) dos extratos foi avaliado pelo método proposto por Wang et al. (2019), usando ácido clorogênico como padrão. Os extratos foram homogenizados em vórtex e, a aliquotas de 200 µL, foram adicionados 200 µL da Solução de Fe^{III} (composta de uma solução 1,5 mM de cloreto férrico e solução 1,5 mM de ferricianeto de potássio, na proporção de 2:1,5) e a mistura foi agitada em vórtex e reservada por 10 minutos.

Em seguida, 200 µL de cada mistura foram transferidos para microplaca de 96 poços e foi realizada a leitura das amostras por espectroscopia ultravioleta-visível (UV-VIS), a 790 nm (FlexStation III, Molecular Devices, California, EUA - com Softmax PRO 5.4).

Todas as análises foram realizadas em triplicata, os valores de conteúdo fenólico total (CFT) foram comparados por análise de variância (*one-way* ANOVA) utilizando o *software* Graphpad Prism (versão 5.0) para seleção dos melhores solventes de extração, o nível de confiança utilizado foi de 95%. Foram selecionados os 2 solventes que apresentaram a maior capacidade de extração de compostos fenólicos do farelo do girassol para avaliação da estabilidade.

2.4.1 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC

Os extratos com os melhores resultados obtidos pelo método de quantificação utilizado (WANG et al., 2019) e o controle foram analisados em HPLC, para quantificação e avaliação do perfil de compostos fenólicos. Esses resultados foram usados como critério de desempate para seleção dos solventes que não apresentaram diferença significativa da capacidade extratora. Foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector PDA (arranjo de diodos) e forno de coluna (Perkin Elmer, Flexar, Connecticut, EUA). Coluna de fase reversa 100-5-C18 4.6 × 250 mm (Kromasil), na temperatura de 40 °C, volume de injeção de 20 µL, fluxo de 0,8 mL/min. Nas fases móveis foram utilizadas: 0,3% de ácido fórmico em H₂O (A); Metanol 100% (B); Acetonitrila 100% (C) e gradiente de eluição: 0,1 min, 85% A, 14,5% B e 0,5% C; 7 min, 55% A, 43,5% B e 1,5% C; 14 min, 5% A 93% B e 2% C; 20 min, 1% A, 97% B e 2% C; 23 min, 15% A, 83% B e 2% C; e 23-33 min, 85% A, 14,5% B e 0,5% C. O padrão utilizado foi o ácido clorogênico (1,4,5-trihydroxycyclohexanecarboxylic acid 3-(3,4-dihydroxycinnamate)), grau de pureza ≥ 95%, Sigma-Aldrich). Uma solução de H₂O:Metanol (97:3, v/v) foi usada para diluir os padrões e as amostras. A análise dos compostos foi feita em duplicata e duplicata de injeção, em 260, 280 e 320 nm e a identificação foi realizada de acordo com os tempos de retenção.

2.5 ESTUDO DA ESTABILIDADE

Os dois extratos selecionados e o extrato hidroetanólico, usado como controle, passaram por teste de estabilidade ao calor, à luz e ao armazenamento ao longo do tempo, em diferentes temperaturas ($25 \pm 4^\circ\text{C}$; $8 \pm 4^\circ\text{C}$ e $-18 \pm 3^\circ\text{C}$), segundo Dai et al (2014).

Para a estabilidade térmica, os extratos foram acondicionados em tubos de vidro vedados e submetidos a banho térmico pré-aquecido a 80, 60 e 40 °C. Alíquotas foram amostradas após 10, 30, 60 e 120 minutos, seguidos de resfriamento em banho de gelo.

A ação da incidência de luz artificial foi determinada com os extratos em temperatura ambiente; os tubos de vidro vedados foram expostos diretamente à luz fluorescente com radiação ativa (RFA) = $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (dia-luz, OSRAM®, 20 W) e fotoperíodo de 16 h de luz. Tubos controle foram expostos às mesmas condições, porém protegidos por papel alumínio. Alíquotas foram amostradas após 3, 7 e 15 dias para análise.

Para avaliar o efeito do armazenamento dos extratos sob refrigeração, congelamento e em temperatura ambiente, as amostras foram mantidas em tubos de microcentrífuga em refrigerador ($8 \pm 4^\circ\text{C}$), congelador ($-18 \pm 3^\circ\text{C}$) e temperatura ambiente ($25 \pm 4^\circ\text{C}$). Após 1, 7, 15, 30 e 60 dias, alíquotas foram amostradas para análise.

O tempo 0 de todas as análises foi avaliado no dia do preparo dos extratos e utilizado para comparação da perda de compostos fenólicos.

A análise consistiu na quantificação, pelo método proposto por Wang (2019), do teor de compostos fenólicos totais/residuais (CFT) nas amostras. As amostras foram analisadas em triplicata e o estudo da estabilidade foi avaliado em duplicata. Os resultados foram avaliados por análise de variância (*two-way* ANOVA) utilizando o *software* Graphpad Prism (versão 5.0) com nível de confiança de 95%.

3. RESULTADOS

3.1 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

No total foram realizadas sete combinações de NADES, além do controle (etanol 40%), e os resultados destas análises estão apresentados na Tabela 2. O NADES que proporcionou a melhor extração de compostos fenólicos foi o composto por AL:G, seguido de CC:AC; CC:GL e AC:S. Estes três últimos não apresentaram diferença significativa entre si, por isso passaram por uma análise em HPLC onde foi escolhido o solvente que conseguiu extrair maiores quantidades de ácido clorogênico de acordo com esse método de quantificação.

Tabela 3. 2. Composição dos NADES, concentração de compostos fenólicos, pH e atividade água

Sigla	Componentes do NADES		Relação molar	CFT (mg/L)	pH	Aw
AC:S	Ácido cítrico	Sacarose	1:1	56,77±5,96 ^b	0,98	0,67
AC:G	Ácido cítrico	Glicose	2:1	29,30±5,25 ^d	0,10	0,58
AL:G	Ácido láctico	Glicose	5:1	95,54±1,76 ^a	0,73	0,68
CC:G	Cloreto de colina	Glicose	1:1	44,19±4,88 ^c	7,98	0,20
CC:GL	Cloreto de colina	Glicerol	1:1	60,39±5,16 ^b	6,35	0,08
CC:AC	Cloreto de colina	Ácido cítrico	1:1	62,67±3,64 ^b	0,00	0,51
CC:AL	Cloreto de colina	Ácido láctico	1:1	48,68±4,65 ^c	1,10	0,16
Et	Etanol	Água	40%*	33,72±4,03 ^d	5,54	0,92

*(v/v)

3.1.1 Identificação e quantificação por HPLC

Os cromatogramas apresentam o pico do ácido clorogênico a 320 nm nos extratos do farelo de girassol (Figura 1). O extrato com maior concentração foi o hidroetanólico, em seguida o NADES AL:G com 22% menos que o Et e, por último, CC:GL, 45% menor que o controle e 29% menor que o extrato AL:G (Tabela 2), a concentração de ácido clorogênico foi determinada por estimativa em comparação à área do pico na concentração de 10 mg/L (Tabela Suplementar 1).

Tabela 3. 3. Valores médios de concentração de ácido clorogênico, tempo de retenção, área do pico dos cromatogramas nos extratos a 320 nm.

Amostras	Tempo de retenção (min)	Área	Fator de diluição (fd)	[ácido clorogênico] mg/l*
ET	8,545	3420835	25	1034,27
AL:G	8,576	1335880	50	807,79
CC:GL	8,511	946030	50	572,05
AC:S	8,310	11277,7	100	87,06
CC:AC	8,248	47871,4	100	370,75

*Estimativa pela área do pico do ácido clorogênico a 10 mg/L.

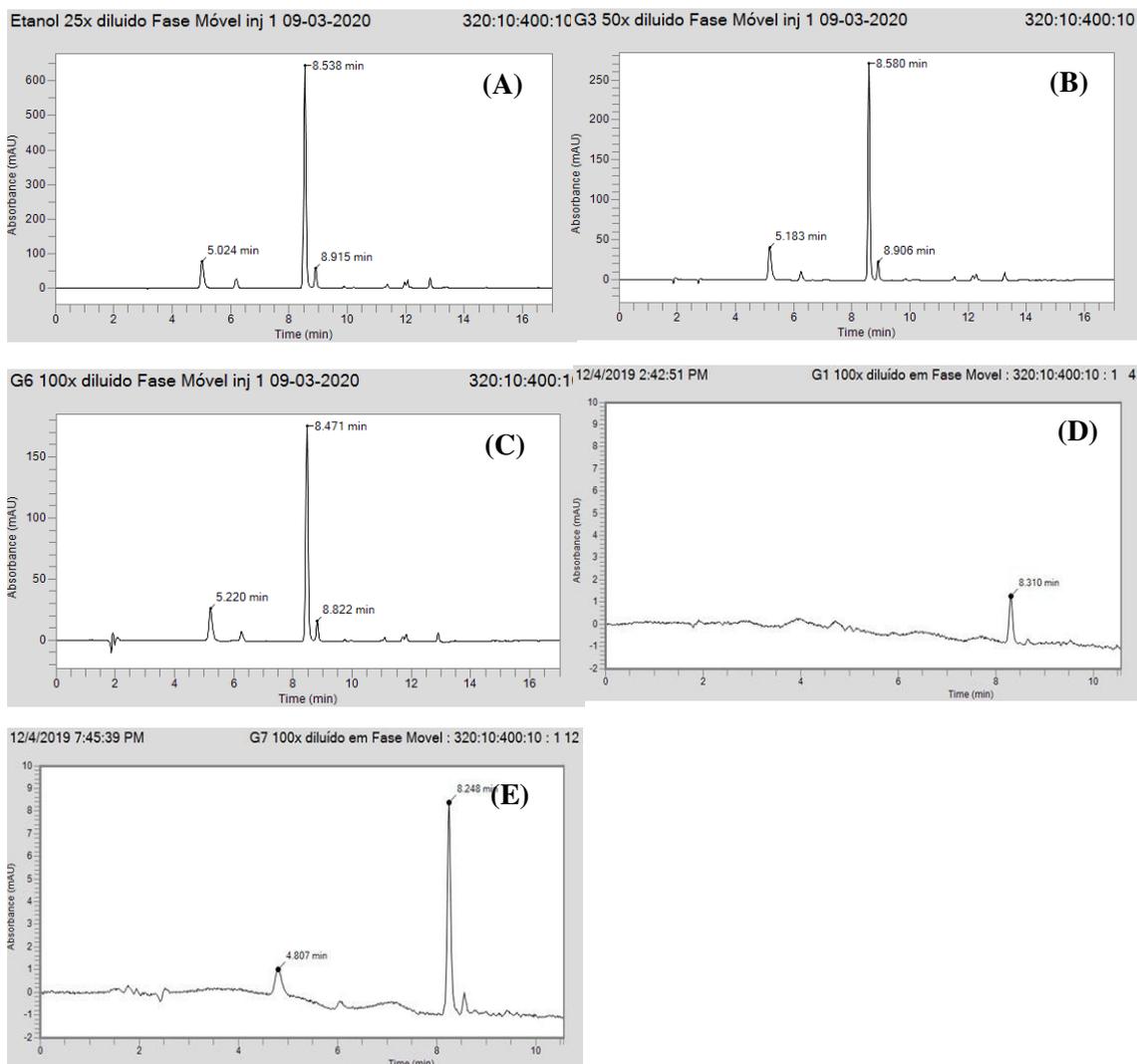


Figura 3. 1. Cromatogramas de uma repetição da injeção do extrato hidroetanólico (A), AL:G (B), CC:GL (C), AC:S (D) e CC:AC (E) do farelo de girassol a 320nm, diluído 25x, 50x, 50x, 100x e 100x respectivamente.

3.2 ESTUDO DA ESTABILIDADE

A partir da identificação e quantificação por HPLC e pelo método de Wang et al. (2019) foram escolhidos como para a avaliação da estabilidade os NADES formados por ácido láctico:glucose e cloreto de colina:glicerol, além do controle realizado com Etanol 40%.

3.2.1 Estabilidade ao calor

Na Figura 2 estão apresentados os resultados obtidos para estabilidade ao tratamento térmico dos 3 extratos avaliados. A Figura 2 apresenta a estabilidade do extrato hidroetanólico. O tratamento a 40°C provocou degradação no extrato controle após 10 minutos, apresentando redução significativa de 44,83 mg/L para 34,32 mg/L de ácido

clorogênico, mas teve um aumento de 38% após 120 min. A 60°C este comportamento se repetiu, com redução de 7% e aumento de 42% nos T10 e T120, respectivamente. Não houve perda registrada na temperatura de 80°C. Não houve diferença significativa entre as diferentes temperaturas aplicadas após 120 min. de tratamento.

No extrato obtido com NADES AL:G (Figura 2), de um modo geral não houve perdas de CFT, apenas manutenção ou aumento, apenas o T60 a 60°C não diferiu significativamente do tempo zero. Em todos os outros tempos, nas diferentes temperaturas, o CFT foi superior ao T0, sendo os maiores aumentos no T10 em 40°C e 80°C, com 18% e 16%. Nas outras temperaturas houve maiores concentrações de CFT, com um aumento significativo no T30 a 80°C de 15% em comparação do tempo 0.

Em contrapartida, no extrato obtido com NADES CC:GL (Figura 2), não houve diferença significativa entre os tempos de tratamento a 40°C e 80°C, apenas a 60°C houve uma redução de 17% na concentração de compostos fenólicos do extrato, que não se manteve até o T120, pelo contrário, aumentou 12% em comparação com o T0. O teor de compostos fenólicos desse extrato no T10 a 40°C (70,82 mg/L) foi igual ao teor nos extratos testados nas temperaturas de 60° e 80°C, porém estas foram diferentes entre si com 61,48 mg/L e 76,98 mg/L, respectivamente.

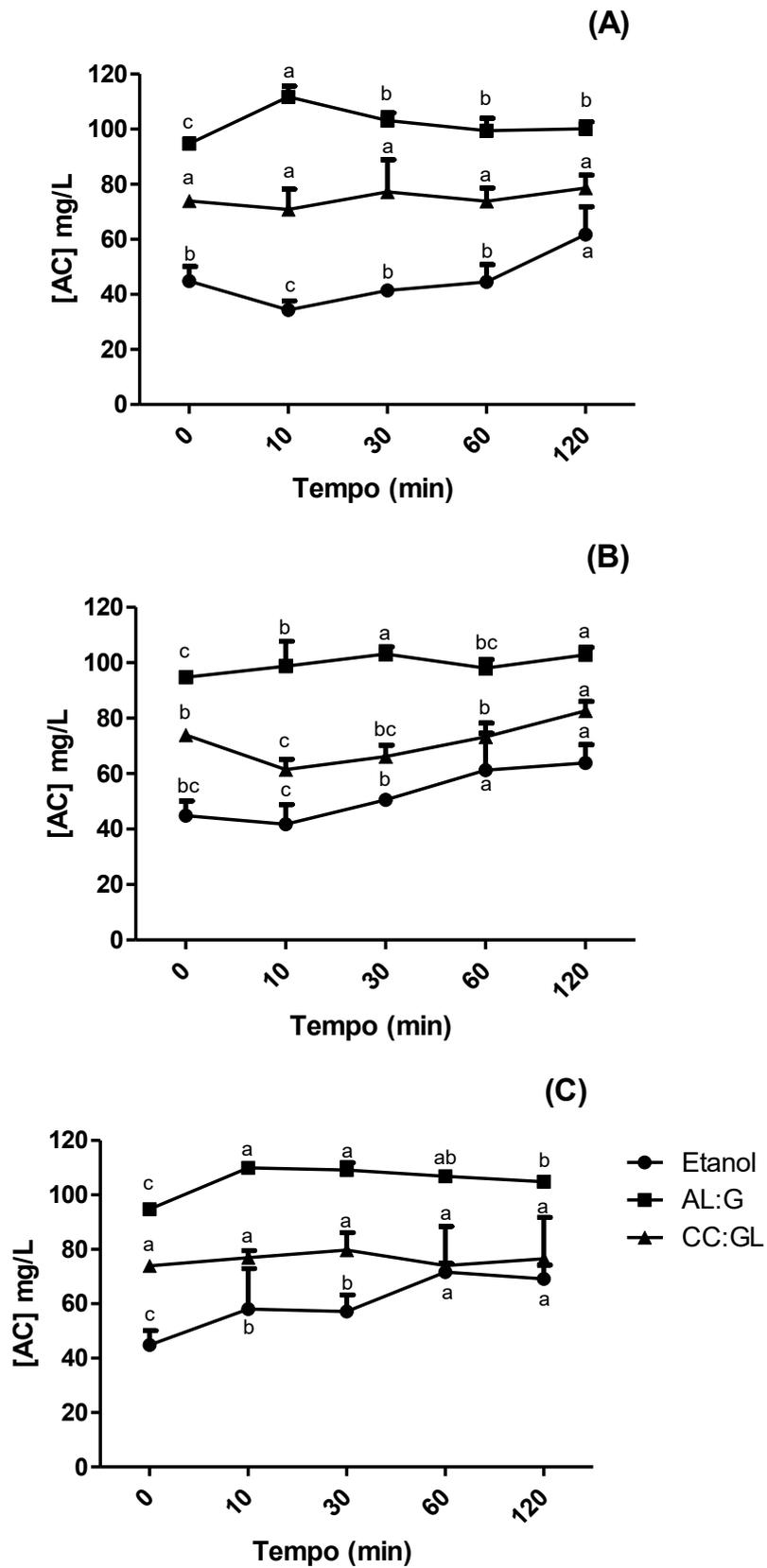


Figura 3. 2. Estabilidade ao calor dos extratos fenólicos do farelo de girassol. (A) 40°C; (B) 60°C; (C) 80°C. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre os tempos de tratamento no mesmo solvente.

3.2.2 Estabilidade ao armazenamento

A Figura 3 apresenta os resultados obtidos para a concentração de compostos fenólicos nos diferentes extratos armazenados em temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$), de refrigeração ($8^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$) e de congelamento ($-18^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$), ao longo do tempo. De um modo geral não houve diferença em relação à temperatura, apenas em relação ao tempo de armazenamento. A perda mais significativa se deu após 7 dias (D7) para todas as temperaturas de armazenamento, sendo mais expressiva em temperatura ambiente (25°C) com 46% de perda, mas essa perda não foi mantida após os 60 dias de armazenamento.

No extrato AL:G (Figura 3), com exceção do D60, as temperaturas de armazenamento não apresentaram diferença significativa ao longo do tempo. Assim como no extrato hidroetanólico, a maior perda aconteceu no D7 (-18°C : 74,79 mg/L; 8°C : 73,5 mg/L; 25°C : 74,77mg/L) e estes não diferiram significativamente do D30 (-18°C : 77,25 mg/L; 8°C : 78,4 mg/L; 25°C : 77,89 mg/L).

A maior perda do extrato CC:GL (Figura 3) foi no D30, no armazenamento a 8°C a perda atingiu 71% em comparação com o D0. Este tipo de armazenamento obteve uma redução constante até o D30, com um aumento de 55% em 30 dias de armazenamento (D60). Os extratos armazenados em freezer (-18°C) e temperatura ambiente tiveram maior perda no D7, mas aumentaram durante os 53 dias seguintes.

Ao final dos 60 dias de tratamento, as seguintes temperaturas de armazenamento foram as que melhor preservaram o CFT: temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$) para o NADES CC:GL com 86,04 mg/L de ácido clorogênico, freezer ($-18^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) para o NADES AL:G com 95,90 mg/L e geladeira ($8^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$) para o Etanol 40% com 47,87 mg/L.

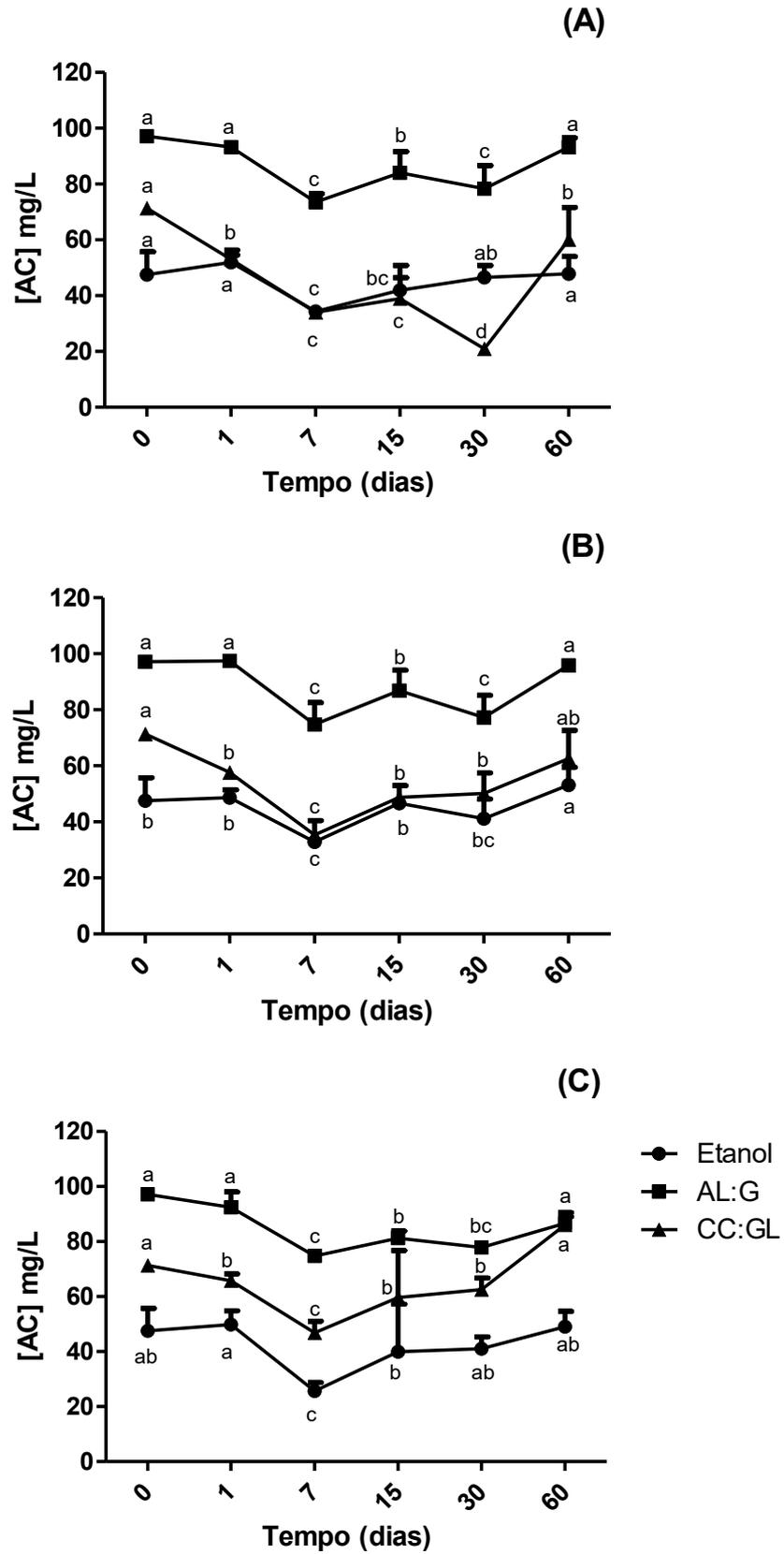


Figura 3. 3. Estabilidade ao armazenamento, em diferentes temperaturas, do extrato fenólico do farelo de girassol. (A) 8°C ± 4°C; (B) -18°C ± 3°C; (C) 25°C ± 4°C. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa ao longo do tempo de armazenamento no mesmo solvente.

3.2.3 Estabilidade à luz

A Figura 4 apresenta os resultados obtidos para a concentração de compostos fenólicos nos diferentes extratos que foram expostos à luz artificial branca e o controle, que passou pelo tratamento envolto em papel alumínio. Levando em consideração que o dia 0 é 100% foi observado um aumento de 135% na amostra e no controle após 1 dia de exposição no extrato hidroetanólico (Figura 4A e B). Não houve diferença significativa entre a amostra e o controle nos dias analisados.

No NADES formado por AL:G (Figura 4) não houve perda significativa de CFT até o dia 15, quando houve uma perda de 4% da amostra e 3% do branco em comparação ao dia 0.

Porém pela observação da Figura 4, verifica-se que o NADES composto de CC:GL não foi capaz de manter o CFT do extrato estável sob luz branca, uma vez que ocorreu uma redução significativa a partir do dia 7 de 21% e de 35% no dia 15 na amostra.

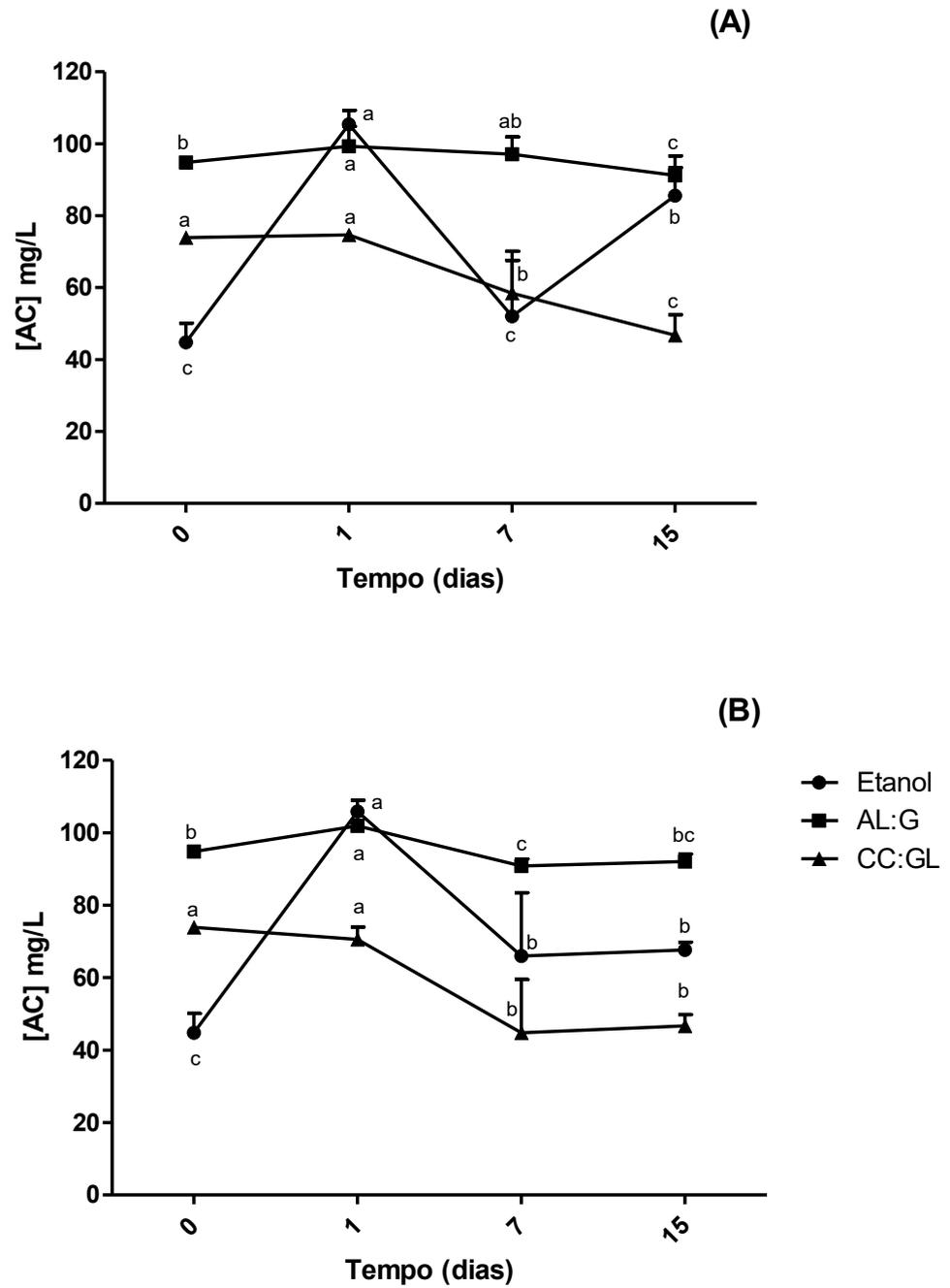


Figura 3. 4. Estabilidade à luz do extrato fenólico do farelo de girassol. (A) Amostra; (B) Branco. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre os dias de tratamento no mesmo solvente

4. DISCUSSÃO

4.1 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

O principal método utilizado para quantificação de compostos fenólicos é o que se utiliza do reagente de Folin-Ciocalteu (FOLIN; CIOCALTEU, 1927), inclusive nas extrações utilizando NADES (BARBIERI et al., 2020; CHANIOTI; TZIA, 2018; FERNÁNDEZ et al., 2018a), porém durante a aplicação desse método houve a formação de gás nos solventes que continham ácidos e, nos NADES formados por cloreto de colina, ocorreu uma precipitação quando em contato com o reagente de Folin-Ciocalteu. Por isso, um método alternativo foi proposto (WANG et al., 2019) e este não mostrou nenhuma incompatibilidade com os NADES. A viscosidade dos NADES foi uma das dificuldades para análise do CFT dos extratos. Mesmo com a adição de 30% de água, esta característica dificultou a separação da parte sólida da líquida. Algumas combinações de NADES, principalmente as que continham sacarose ou ácido cítrico em sua composição, se mostraram mais viscosas que outras, dificultando retirada da alíquota.

Entre os métodos utilizados para quantificação a cromatografia apontou o etanol 40% como o extrato com maior teor de ácido clorogênico, porém pelo método proposto por Wang et al. (2019) o mesmo extrato obteve um resultado 30 vezes menor e, em análises preliminares, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, obteve 51,50 mg de ácido gálico/mL que, quando comparado ao valor encontrado pelo método de Wang et al. (2019) para esse mesmo extrato, foi 1,5 vezes maior, porém ainda inferior aos valores obtidos para os extratos com NADES. Houve uma diferença de quantificação entre o HPLC e o método de Wang et al. (2019), na cromatografia a ordem de concentração de CGA foi: Et > AL:G > CC:GL, enquanto que pelo método de Wang et al. (2019) a ordem foi: AL:G > CC:GL > Et. Ocorreu um aumento entre os dois métodos de 30 vezes no extrato de etanol 40%, 8 vezes no NADES formado por AL:G e 9 vezes no NADES formado por CC:GL, mostrando que o método químico é menos eficiente para quantificação do ácido clorogênico em todos os extratos avaliados. Os melhores NADES foram escolhidos por comparação entre eles, porém a comparação destes com o etanol depende do método aplicado. O grupo dos CGA apresenta diversos isômeros (CLIFFORD, 2000; OLIVEIRA; BASTOS, 2011), mas apenas o maior pico a 320 nm, correspondente ao isômero do CGA: 3-(3,4-di-hidroxicinamato) do ácido 1,4,5-trihidroxiclohexanocarboxílico foi quantificado no HPLC, por isso é importante ressaltar que outros ésteres, assim como outros compostos fenólicos, agentes redutores e

compostos hidroxilados também reagem no método proposto por Wang e no de Folin-Ciocalteu.

O método de Folin-Ciocalteu se baseia na redução dos óxidos de tungstênio e molibdênio, reagentes que compõem a solução, identificada pela formação de uma cor azulada. Este método identifica todos os compostos aromáticos, que se torna uma desvantagem do método: por ser inespecífico pode reagir com aminas aromáticas e proteínas, por exemplo (ROVER; BROWN, 2013). O método proposto por Wang et al. (2019) se baseia na oxidação dos grupos hidroxila do ácido clorogênico devido à incorporação da solução de Fe (III), que causa uma alteração conformacional nos CGA e gera uma coloração azulada com absorvância máxima a 790 nm, o CGA é degradado em temperaturas acima de 100°C, por isso uma das interferências nesse método é a temperatura da amostra no momento da análise (WANG et al., 2019). A ocorrência de outros compostos fenólicos, diferentes do CGA usado como padrão, pode ser observada nas Figuras Suplementares 2, 3 e 4, que apresentam os cromatogramas dos extratos obtidos em comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Verifica-se nesses cromatogramas, especialmente a 260 nm, que há uma maior diversidade de compostos, especialmente com maiores tempos de retenção, nos extratos obtidos com NADES, indicando uma maior eficiência na extração de compostos mais apolares, quando em comparação com a solução etanólica.

Ye (2015) utilizou diversos solventes orgânicos a fim de obter os compostos fenólicos das flores do raio e estigma do girassol, conseguindo melhores resultados com metanol 90% e 50% em ambas as amostras. Isopropanol alcançou melhor extração em fenólicos de coprodutos do girassol quando comparado com etanol e metanol (WEISZ; CARLE; KAMMERER, 2013) mostrando que o poder de extração depende da proporção utilizada e do solvente orgânico. Diferentes formulações de NADES apresentaram maior eficiência do que os solventes orgânicos convencionais em outras oleaginosas como no bagaço de azeitona (CHANIOTI; TZIA, 2018; FERNÁNDEZ et al., 2018a) e pele do amendoim (SYAHDI et al., 2020). Dai (2016) usou NADES para extrair antocianidinas das pétalas de *Catharanthus roseus* comparando com metanol com 3% de ácido fórmico. Tiveram maior poder de extração, entre os NADES, aqueles formados por ácido láctico:glicose, 1,2-propanodiol:cloreto de colina e glicose:frutose:sacarose, sem diferença significativa para o solvente orgânico.

4.2 ESTUDO DA ESTABILIDADE

Apenas alguns estudos avaliaram a estabilidade dos compostos fenólicos extraídos com NADES em condições e matérias-primas diversas como cártamo (DAI; VERPOORTE; CHOI, 2014), pétalas de *Catharanthus roseus* (DAI et al., 2016), cúrcuma (JELIŃSKI; PRZYBYŁEK; CYSEWSKI, 2019), bagaço de oliva, semente de cebola, coprodutos do tomate e pera (FERNÁNDEZ et al., 2018a). Os resultados obtidos no presente trabalho não foram de acordo com o esperado, mas ainda pode-se tirar algumas indicações dos resultados obtidos.

4.2.1 Estabilidade ao calor

O etanol é volátil, portanto, o aumento da CFT no extrato hidroetanólico quando exposto ao calor pode ser justificado pela concentração do extrato devido à volatilização do etanol com o aumento da temperatura. Por isso os resultados a 40°C mostraram maiores reduções do teor de CFT quando comparado a 60 e 80°C: possivelmente, houve degradação dos compostos fenólicos sem significativa evaporação solvente. No extrato hidroetanólico ocorreu uma perda significativa a 40°C após 10 minutos, os NADES sob estas mesmas condições não apresentaram perdas significativas. De uma forma, geral o NADES formado por AL:G apresentou boa estabilidade, com mas aumento da concentração de CFT nas temperaturas e tempos de tratamento mais elevados, o que pode ter sido gerado pela evaporação da água, adicionada na proporção de 30%, a fim de diminuir a viscosidade. O NADES composto de CC:GL foi o solvente que teve melhor estabilidade em todas as temperaturas e tempos. O estudo da estabilidade ao calor de todos os solventes precisa ser repetido, utilizando frascos com melhor vedação, além de ampliação dos tempos/temperaturas a fim de verificar a degradação do CGA em ambos os NADES.

Nos testes para avaliação da estabilidade, Dai et al. (2016) observaram que houve menor degradação de antocianinas em NADES do que em etanol com 3% de ácido fórmico, a 60°C. Em outro estudo, Dai et al. (2014) avaliaram a estabilidade ao calor da cartamina, que teve melhor estabilidade em NADES de xilitol:cloreto de colina (5:2) em todas as temperaturas, em comparação com a água.

4.2.2 Estabilidade ao armazenamento

Os resultados deste ensaio foram os mais inesperados, houve redução e recuperação do teor de CFT ao longo do tempo, com uma redução expressiva em todos os extratos no dia 7. Pode ter ocorrido algum erro de homogeneização das amostras no momento de alíquotar para o estudo ou no dia da análise do dia 7, visto que todas as amostras tiveram esta redução neste dia específico. A alta viscosidade dos NADES pode ter sido responsável pela dificuldade na alíquotagem dos extratos, o que pode ter levado a diferenças de concentração inicial nas alíquotas avaliadas. Após o dia 7, ocorreu uma precipitação das amostras de NADES que ficaram sob refrigeração e congelamento, mas isto não ocorreu em amostras que foram armazenadas em ultrafreezer a - 80°C para análises futuras. Esta alteração poderia ter afetado a concentração de CFT das amostras. A avaliação da estabilidade dos extratos ao armazenamento precisa ser repetida para averiguar possíveis erros analíticos e também uma avaliação acelerada da estabilidade utilizando uma temperatura mais alta que a temperatura ambiente em um tempo mais curto.

Dai (2016) também avaliou o armazenamento de extratos com NADES, após três meses armazenados a -20°C. Neste estudo a concentração de CFT se manteve estável nos solventes testados, porém o mesmo não ocorreu com os extratos obtidos com etanol acidificado. Em Dai (2014) houve estabilidade da cartamina ao armazenamento em todos os NADES testados por 7 dias a -20°C, porém, no solvente formado por cloreto de colina:sacarose (4:1), a estabilidade se estendeu até o 15º dia. Os compostos fenólicos extraídos de coprodutos de oliva, semente de cebola, tomate e pera com NADES de ácido láctico:glicose (5:1) tiveram a estabilidade mantida por dois meses a -18°C e 4°C, mas houve perda de 90% de apigenina e quercetina no extrato aquoso (FERNÁNDEZ et al., 2018a).

Há ainda relatos na literatura sobre estabilidade de compostos fenólicos em matérias-primas ou produtos e não em extratos. Cheng et al. (2017) avaliaram o conteúdo fenólico total de *bayberry* (*Myrica rubra*) em pó, obtido por liofilização ou por aspersão, durante 50 dias, sob temperatura de 4°C ou 25°C e verificaram que houve pouca perda de compostos fenólicos nos pós, tendo uma perda máxima 22% a 25°C em ambos os procedimentos. Segundo o estudo, a perda maior foi nas amostras que passaram pela secagem por aspersão, pois este é um método que aplica altas temperaturas para obtenção do pó de *bayberry*, levando a perda de compostos fenólicos já neste procedimento. Tavares et al. (2019) armazenaram suco de jambolão em pó por 150 dias a 4, 25 e 35°C e, no final do período, as amostras a 35°C ainda

possuíam 96% do conteúdo fenólico total. Um estudo armazenou, por 6 meses, purê de cereja ácida, com diferentes edulcorantes, a 4°C e 30°C, e a menor perda foi de 7% na amostra de purê com eritritol a 4°C, enquanto a maior perda foi de 54% a 30°C com adição de glicosídeo de esteviol (NOWICKA; WOJDYŁO, 2016).

4.2.3 Estabilidade à luz

No extrato hidroetanólico pode ter ocorrido evaporação do solvente durante a exposição a luz, mais perceptível após 1 dia, pois, possivelmente, a redução no teor de CFT foi mais expressiva do que a volatilização do solvente nos dias subsequentes. O mesmo padrão de aumento depois de 24 h foi visto no NADES formado por AL:G, com maior concentração de CFT, mostrando que o tempo de tratamento não foi o suficiente para compensar a evaporação de solvente. No solvente composto de CC:GL não houve aumento no primeiro dia, como nos outros extratos, e a luz acelerou a degradação significativamente até o dia 15. Entretanto, não houve diferença significativa entre a amostra exposta diretamente à luz e a coberta por papel alumínio, indicando que este não foi eficiente na conservação da amostra durante a exposição à luz branca. Como observado na Tabela 1, o NADES formado por CC:GL foi o que mostrou menor A_w (0,08), ou seja, menor concentração de água livre disponível para evaporação ao longo dos experimentos, ao contrário do NADES de AL:G que por apresentar uma A_w mais alta (0,68) e continha mais água livre.

Jeliński (2019) testou a estabilidade da curcumina utilizando NADES a base de cloreto de colina após exposição à luz artificial por 120 minutos. Apenas 5% da curcumina permaneceu após o tratamento em solução de metanol, 19% no pó da cúrcuma e no NADES composto do cloreto de colina:glicerol (1:1) a curcumina permaneceu estável por todo o período de exposição a luz. Dai (2014) testou a estabilidade da cartamina à luz branca, no NADES formado de ácido láctico:glicose e prolina:ácido málico, a luz acelerou o processo de degradação, assim como nas amostras com etanol 40%. Os melhores solventes deste estudo foram sacarose:cloreto de colina, glicose:cloreto de colina e água, porque não foram registradas perdas após a exposição a luz (DAI; VERPOORTE; CHOI, 2014).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O reaproveitamento do farelo de girassol é necessário, pois esta é uma matéria-prima rica em diversos componentes, além dos compostos fenólicos, que não apresenta destino rentável e que, com a técnica certa, podem ser valorizados pela indústria. Este trabalho indicou que os compostos fenólicos podem ser extraídos por NADES, solventes que reafirmam a presença cada vez mais constante e desejada de uma química verde e, além disso, melhorar a estabilidade dos ácidos clorogênicos do farelo de girassol. Novas análises estão previstas, com a aplicação de estratégias para evitar a evaporação e uso de altas temperaturas para provocar a degradação nos extratos preparados a partir dos NADES. Esperamos obter maiores esclarecimentos a partir dos próximos experimentos

APÊNDICES

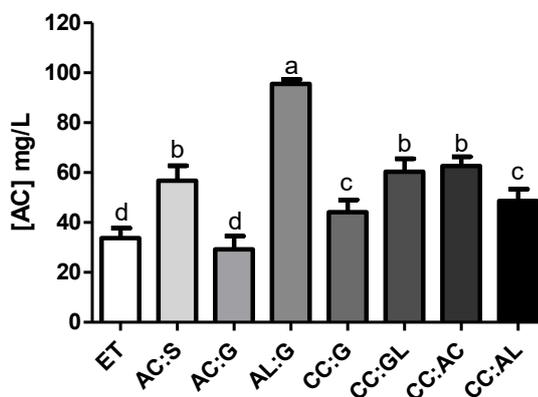


Figura Suplementar 3. 1. Quantificação de composto fenólicos totais em etanol (40%) e nos NADES testados

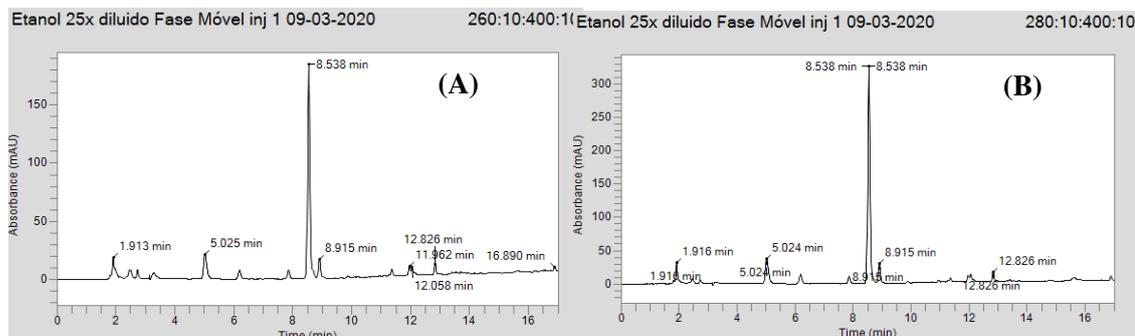


Figura Suplementar 3. 2. Cromatogramas de uma repetição da injeção do extrato hidroetanólico do farelo de girassol a (A) 260nm e (B) 280nm, diluído 25x, respectivamente.

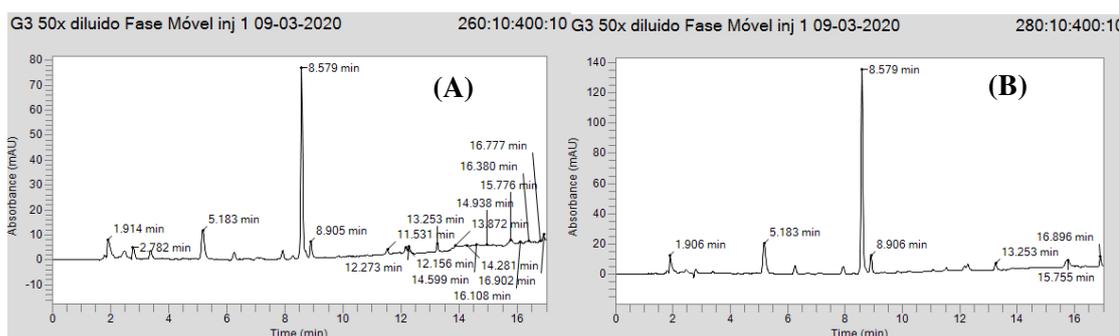


Figura Suplementar 3. 3. Cromatogramas de uma repetição da injeção do extrato AL:G do farelo de girassol a (A) 260nm e (B) 280nm, diluído 50x, respectivamente.

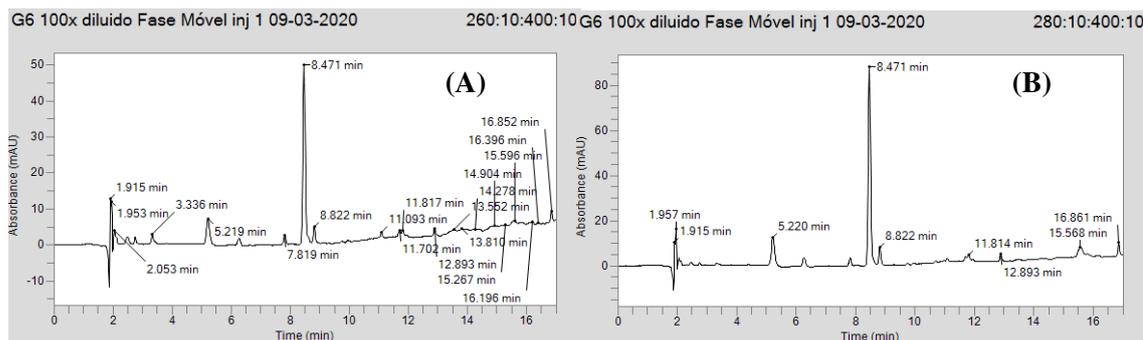


Figura Suplementar 3. 4. Cromatogramas de uma repetição da injeção do extrato CC:GL do farelo de girassol a (A) 260nm e (B) 280nm, diluído 50x, respectivamente.

Tabela Suplementar 3. 1. Tempo de retenção e área do pico do ácido clorogênico na concentração de 10 mg/L.

	[ácido clorogênico] mg/L	tempo de retenção (min)	área
Ácido clorogênico	10	8,548	855295,2
		8,571	838422,9
		8,503	804356,2
		8,559	809405,8

Tabela Suplementar 3. 2. Média e desvio padrão da estabilidade ao calor do extrato hidroetanólico, NADES formado por AL:G e CC:GL.

	40°C	60°C	80°C
Et			
0 min	44,830 ± 5,305	44,831 ± 5,305	44,831 ± 5,305
10 min	34,317 ± 3,344	41,790 ± 7,095	58,084 ± 14,830
30 min	41,482 ± 2,312	50,585 ± 1,688	57,187 ± 6,023
60 min	44,522 ± 6,364	61,289 ± 13,285	71,658 ± 3,230
120 min	61,758 ± 10,05	63,824 ± 66,625	69,141 ± 5,140
AL:G			
0 min	94,769 ± 1,374	94,769 ± 1,374	94,769 ± 1,374
10 min	111,737 ± 3,935	98,753 ± 8,960	109,939 ± 1,488
30 min	103,190 ± 2,783	103,184 ± 2,602	109,129 ± 2,765
60 min	99,458 ± 4,52	98,055 ± 3,108	106,876 ± 2,204
120 min	100,144 ± 2,555	102,838 ± 2,686	104,810 ± 0,990
CC:GL			
0 min	73,922 ± 1,415	73,922 ± 1,415	73,922 ± 1,415
10 min	70,819 ± 7,420	61,479 ± 3,645	76,981 ± 2,525
30 min	77,245 ± 11,743	66,130 ± 4,122	79,769 ± 6,395
60 min	73,883 ± 4,734	73,231 ± 5,012	74,035 ± 14,445
120 min	78,665 ± 4,640	82,685 ± 3,326	76,505 ± 15,230

Tabela Suplementar 3. 3. Média e desvio padrão da estabilidade a luz artificial branca do extrato hidroetanólico, NADES formado por AL:G e CC:GL.

	Dia 0	Dia 1	Dia 7	Dia 15
Et				
Teste	44,778 ± 5,363	105,391 ± 3,808	52,016 ± 15,582	85,570 ± 11,056
Branco	44,778 ± 5,636	105,872 ± 3,078	65,984 ± 17,427	67,677 ± 2,144
AL:G				
Teste	94,769 ± 1,374	99,305 ± 5,545	97,063 ± 4,826	91,209 ± 2,134
Branco	94,769 ± 1,374	101,887 ± 0,668	90,831 ± 1,933	92,021 ± 2,247
CC:GL				
Teste	73,922 ± 1,415	74,698 ± 1,102	58,466 ± 11,651	46,802 ± 5,653
Branco	73,922 ± 1,415	70,579 ± 3,414	44,781 ± 14,735	46,726 ± 3,074

Tabela Suplementar 3. 4. Média e desvio padrão da estabilidade ao armazenamento, em diferentes temperaturas do extrato hidroetanólico, NADES formado por AL:G e CC:GL.

	Dia 0	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 60
Et						
-18°C ± 3°C	47,512 ± 8,188	48,613 ± 2,823	32,891 ± 2,042	46,614 ± 0,756	41,148 ± 7,012	53,137 ± 6,362
8°C ± 4°C	47,512 ± 8,188	51,967 ± 2,572	34,327 ± 1,926	41,940 ± 8,895	46,570 ± 4,250	47,873 ± 6,197
25°C ± 4°C	47,512 ± 8,188	49,801 ± 5,067	25,690 ± 3,034	39,950 ± 17,324	41,0422 ± 4,331	49,086 ± 5,522
AL:G						
-18°C ± 3°C	97,125 ± 1,589	97,486 ± 2,060	74,786 ± 7,805	86,864 ± 7,260	77,245 ± 7,867	95,896 ± 2,210
8°C ± 4°C	97,125 ± 1,589	93,225 ± 1,578	73,501 ± 3,075	84,041 ± 7,600	78,395 ± 8,270	93,237 ± 3,292
25°C ± 4°C	97,125 ± 1,589	92,462 ± 5,568	74,769 ± 1,547	81,236 ± 2,586	77,885 ± 1,720	86,612 ± 2,401
CC:GL						
-18°C ± 3°C	71,372 ± 0,995	57,633 ± 1,285	35,313 ± 5,114	48,797 ± 4,107	50,168 ± 7,239	62,527 ± 10,165
8°C ± 4°C	71,372 ± 0,995	53,061 ± 3,248	34,044 ± 1,357	38,959 ± 7,503	20,955 ± 2,235	60,027 ± 11,665
25°C ± 4°C	71,372 ± 0,995	65,731 ± 2,512	46,893 ± 4,163	59,669 ± 17,040	62,545 ± 4,167	86,037 ± 4,508

CAPÍTULO 4

Atividade citotóxica de compostos fenólicos do farelo de girassol extraídos por NADES em células tumorais de mama MCF-7

Resumo

Câncer é o denominado o crescimento desordenado de células que sofreram uma alteração no seu DNA, sendo considerada a principal causa de mortalidade prematura no mundo e as neoplasias mais comuns são de pulmão, mama, colón e próstata. No câncer de mama essa proliferação desordenada acontece no tecido mamário e os dois tipos mais comuns, invasivo ductal e o invasivo de mama lobular, representam 70% dos casos. Alguns fatores de risco para o tumor mamário são idade, histórico familiar de tumor e mulheres sem filhos e, mesmo com programas de prevenção e diagnóstico precoce, o câncer de mama apresenta a maior taxa de mortalidade em mulheres. Por possuírem capacidade antioxidante, os compostos fenólicos atuam induzindo enzimas de detoxificação, prevenindo a oxidação e proliferação das células tumorais. O girassol é rico em compostos fenólicos, principalmente os pertencentes a família do ácido clorogênico. O uso destes compostos em células tumorais já foi estudado a partir da extração com solventes orgânicos do farelo de girassol, coproduto da extração do óleo, com resultados promissores. O objetivo deste trabalho foi utilizar duas composições de NADES para extração de compostos fenólicos do farelo desengordurado de girassol na investigação da atividade citotóxica em células tumorais de mama MCF-7. Aplicando o ensaio de Alamar Blue[®], o NADES formado de ácido láctico:glicose (5:1) teve melhor desempenho na redução da viabilidade das células em comparação ao NADES composto de cloreto de colina:glicerol, com reduções para 20% e 88% de viabilidade celular, respectivamente, nos extratos e para 40% e 80% quando aplicados os NADES puros. Apesar de sugerirem um potencial citotóxico, estes resultados são preliminares, pois são necessários ensaios em células não tumorais para confirmar que tanto os solventes, quanto os extratos não são tóxicos em células saudáveis.

Palavras chaves: citotoxicidade, coproduto, solventes eutéticos profundos naturais, compostos fenólicos

Abstract

Cancer is the name given to the abnormal growth of cells that have undergone a mutation in their DNA, which is considered to be the main cause of premature mortality in the world and the most common are lung, breast, colon and prostate neoplasms. In breast cancer, this abnormal proliferation occurs in the breast tissue and the two most common types are: invasive ductal carcinoma and invasive lobular breast cancer, which represent 70% of the cases. Some risk factors for breast cancer are age, family history of tumor and women that did not bear any children, and even with prevention programs and early diagnosis, breast cancer has the highest mortality rate among women. Because they have antioxidant capacity, phenolic compounds act by inducing detoxification enzymes, preventing the oxidation and proliferation of tumor cells. Sunflower is rich in phenolic compounds, mainly the ones that belong to the chlorogenic acid family. The use of these compounds in tumor cells has already been studied based on the extraction of organic sunflower meal solvents, a by-product of oil extraction, showing promising results. The objective of this work was to use two NADES compositions for the extraction of polyphenols from defatted sunflower meal in the investigation of cytotoxic activity in MCF-7 breast tumor cells. Applying the Alamar Blue® testing, the NADES formed from lactic acid:glucose (5:1) performed better in reducing cell viability compared to the NADES composed of choline chloride:glycerol, with reductions of 20% and 88% of cell viability, respectively, in the extracts and of 40% and 80% when pure NADES were applied. Despite the fact they suggest a cytotoxic potential, these results are preliminary since tests on non-tumor cells are necessary to confirm that both solvents and extracts are not toxic in healthy cells.

Keywords: cytotoxicity, by-product, natural deep eutectic solvents, polyphenols

1. INTRODUÇÃO

Dos 193 países, em 134 o câncer é a primeira ou a segunda maior causa de morte prematura em pessoas com idade entre 30 e 69 anos e terceira ou quarta nos países restantes (IARC, 2020b). Uma projeção do *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN) (2020) prevê para 2040 um total de 29 milhões de diagnósticos de câncer no mundo, principalmente em países de economia emergente. Dentre os tipos de câncer mais incidentes atualmente estão neoplasias de pulmão, mama, colón e próstata (IARC, 2020a).

O farelo do girassol é um coproduto industrial cujo destino é a alimentação animal, porém de 3 a 4% desta matéria prima são compostos fenólicos, dos quais 70% são representados pelo grupo dos ácidos clorogênicos, sendo o éster mais comum o 5-*O*-cafeoilquínico (5-CQA) (LOMASCOLO et al., 2012). Os compostos fenólicos são compostos bioativos e podem atuar no organismo protegendo-o diminuindo o risco de doenças crônicas não transmissíveis, como o câncer (LUNA-GUEVARA et al., 2018). Taha e colaboradores (2011) estudaram o efeito antitumoral do ácido clorogênico, principal composto fenólico da torta do girassol, sobre uma variedade de células tumorais de fígado, laringe, colón, cervical, mama e intestinal. A fração de compostos fenólicos extraída com metanol atingiu o IC₅₀, a dose do composto fenólico capaz de causar morte em 50% das células vivas da linhagem tumoral de mama MCF-7.

Solventes eutéticos profundos naturais (NADES) são solventes alternativos compostos de um doador e um receptor de hidrogênio que quando misturados possuem ponto de fusão menor do que quando separados, líquido a temperatura ambiente. São preparados a partir da mistura de dois ou mais compostos do metabolismo primários como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos (DAI; VERPOORTE; CHOI, 2014; PAIVA et al., 2014).

Alguns estudos já avaliaram a citotoxicidade dos NADES em células cancerígenas, que levantaram a hipótese que NADES compostos por ácidos orgânicos são capazes de aumentar a toxicidade (HAYYAN et al., 2016). Radošević (2016) teve melhor impacto na viabilidade celular ao utilizar NADES em comparação ao metanol.

O objetivo deste trabalho foi utilizar extratos de compostos fenólicos do farelo dessolventizado de girassol com duas formulações de NADES em linhagens de células tumorais de mama MCF-7, investigando sua atividade citotóxica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

O farelo de girassol utilizado neste trabalho foi cedido pela Empresa Caramuru, situada no município de Itumbiara – GO, Brasil. O material foi enviado seco, desengordurado, dessolventizado e peletizado.

2.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Duas combinações de NADES foram utilizadas, nas seguintes relações molares - ácido láctico:glicose (5:1) e cloreto de colina:glicerol (1:1). Os componentes foram pesados e levados para agitação magnética a 50°C, até que um líquido transparente e homogêneo se formasse. Os solventes foram adicionados de água ultra-pura na proporção de 30% (m/m) (RADOŠEVIĆ et al., 2016). Como controle foi utilizado o Etanol 40% na extração dos compostos fenólicos.

Foram pesados 4,5 g da amostra e adicionados a 15 mL de NADES, no extrato hidroetanólico foram pesados 10g da amostra e adicionados em 100 mL de etanol 40%. As amostras foram aquecidas sob agitação magnética até a temperatura de 45°C e, em seguida, foram sonicadas em ultrassom de probe (Ecosonics, QR500, Indaiatuba, Brasil) por 1 minuto, em potência de 500 W/cm² e frequência ultrassônica de 20 kHz (ZARDO et al., 2017). O extrato hidroetanólico foi rotaevaporado a 50°C por 2 horas em SpeedVac™ (Thermo Scientific, SPD121P-220, Massachusetts, EUA)

2.3 CULTURA DE CÉLULAS

A linhagem tumoral de mama MCF-7 foi cultivada em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) Gibco® contendo 4,5 g/L de glicose, suplementado com 2,0 g/L de HEPES, 3,7 g/L de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino (SFB) Gibco® e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina) Gibco®, sendo submetidas a no máximo 20 passagens. As culturas foram mantidas a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

2.4 ATIVIDADE CITOTÓXICA DO EXTRATO DE FARELO DE GIRASSOL SOBRE CÉLULAS HUMANAS DE CÂNCER DE MAMA EM CULTURA

As células foram cultivadas em placas de 96 poços e, após aderência, a suplementação do meio de cultura com SFB foi reduzida a 2% para sincronização do ciclo celular e as células foram assim mantidas por 24 h, a 37°C em atmosfera controlada com 5% de CO₂, até atingirem confluência de, pelo menos, 60%. Para as análises em células, um estoque padronizado contendo 10mg/mL de extrato fenólico foi preparado com os extratos de NADES e hidroetanólico. Após as 24 horas, o meio de cultura foi removido e adicionado das concentrações de estoque preparado contendo extrato fenólico e meio de cultura nas concentrações de 50 a 6000 µL/mL.

2.5 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR REDUÇÃO DE ALAMAR BLUE®

As células foram cultivadas em placas de 96 poços e tratadas com os extratos conforme descrito previamente. Após o tratamento, as células foram expostas a 10% do reagente de Alamar diluído em meio de cultura por 3 h e mantidas a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Procedeu-se a leitura da placa em espectrofotômetro a 570 nm e 600 nm, sendo os dados expressos em percentual de viabilidade em relação ao controle. O controle foi considerado como contendo 100% de viabilidade celular e o que foi determinado a partir de um branco, onde as células foram mantidas em meio de cultura e não sofreram nenhum tipo de tratamento.

3. RESULTADOS

3.1 ATIVIDADE CITOTÓXICA

Quatro amostras foram testadas sobre células da linhagem tumoral de mama (MCF-7), duas combinações de NADES puros (AL:G e CC:GL) e dois extratos obtidos da sonicação do farelo de girassol em NADES (extrato AL:G e extrato CC:GL), a fim de testar a atividade citotóxica tanto do solvente natural quanto dos extratos destes contendo compostos fenólicos.

Melhores resultados foram obtidos com a combinação de ácido láctico:glicose (5:1), que provocou uma redução da viabilidade celular de aproximadamente 34% na concentração de 5000µg/mL. Na concentração a 6000µg/mL, o extrato atingiu redução de 20% enquanto o NADES puro AL:G atingiu redução de 40% (Figura 1A), não houve diferença significativa entre extrato e NADES nesta amostra. Entre o NADES puro de CC:GL e seu extrato contendo

os compostos fenólicos não ocorreu nenhuma diferença significativa nas concentrações testadas e a menor redução da viabilidade celular foi no 88% e 82% no extrato CC:GL e NADES CC:GL, respectivamente (Figura 1B). Os altos valores de erro das análises indicam que ocorreu uma grande variabilidade dentro da amostra, podendo ter sido causada devido à alta viscosidade dos NADES que dificultam a homogeneização e, conseqüentemente, a avaliação dos reais efeitos citotóxicos.

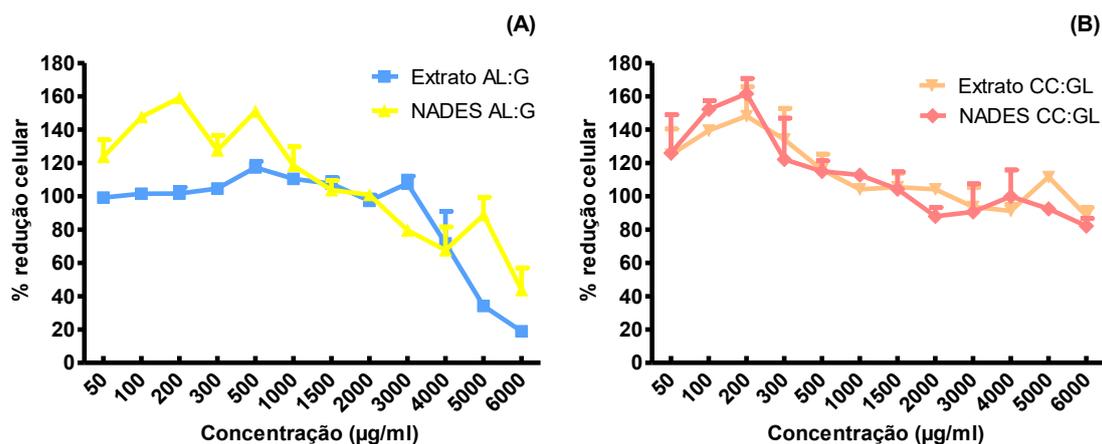


Figura 4. 1. Atividade citotóxica de NADES e extratos com compostos fenólicos na redução celular de linhagem tumoral MCF-7.

4. DISCUSSÃO

O reagente de Alamar Blue[®] trata-se de um corante solúvel em água, estável e não tóxico às células que contém a substância pouco fluorescente resazurina, que é metabolizada por enzimas mitocondriais das células viáveis a resorufina, um composto de alta fluorescência, gerando uma alteração na cor azul índigo para rosa fluorescente podendo ser medida por colorimetria ou fluorimetria que pode ser quantificado (BONNIER et al., 2015), sendo considerado mais sensível que o ensaio de MTT., (AL-NASIRY et al., 2007; KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018).

Não há na literatura, estudos que avaliaram a ação dos compostos fenólicos do girassol e/ou seus coprodutos extraídos por NADES. Porém, um estudo avaliou a bioatividade, em seis linhagens tumorais (fígado, laringe, colón, cervical, mama, intestinal), do ácido clorogênico extraído através de micro-ondas e ultrassom do farelo de girassol com diversos solventes orgânicos. Os melhores resultados foram obtidos pelo extrato com 60% etanol, extraído por 3 minutos com micro-ondas, com exceção da linhagem de mama que apresentou redução mais acentuada e, 80% etanol em agitação por 60 minutos (TAHA et al., 2011).

Panić et al (2019) avaliaram a atividade citotóxica do bagaço da uva e azeitona extraídas em NADES composto de cloreto de colina:ácido cítrico (2:1) e também com NADES puros em linhagens tumorais HeLa e MCF-7 em ensaio de redução de MTS. Após 72 horas, não houve diferença entre os extratos fenólicos dos coprodutos de uva e azeitona ou NADES puros, tendo todos apresentado baixa viabilidade em ambas as linhagens testadas (PANÍĆ et al., 2019a). Nos dois estudos, os solventes naturais são compostos de um ácido orgânico, seria uma explicação para a melhor redução celular neste tipo de formação porque a acidez diminui o pH ótimo para o cultivo das células, visto que o NADES preparado por Panić et al. (2019) tinha pH 0,6 e no NADES AL:G deste trabalho pH 0,73.

A citotoxicidade dos NADES foi avaliada por Ahmadi et al. (2018), preparando diferentes relações molares entre o cloreto de colina e diferentes doadores de hidrogênio da composição dos solventes naturais. Quando a proporção de glicerol aumentou em relação ao cloreto de colina, aconteceu uma redução da toxicidade e o mesmo se repetiu utilizando frutose e 1,2-propanodiol. Mas a viabilidade celular foi prejudicada com a proporção 2,5:1 de cloreto de colina:glicose (AHMADI et al., 2018). A resistência celular ao glicerol pode ser explicada porque em células cancerígenas há uma maior demanda de glicerol no plasma, aumentando a gliconeogênese e a lipogênese (HAYYAN et al., 2016).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do resultado obtido, com uma aparente redução da viabilidade celular a partir do extrato fenólico de farelo de girassol de NADES formado por ácido láctico:glicose e do próprio solvente puro, estes resultados ainda são preliminares. O resultado pode sugerir que os compostos fenólicos do farelo do girassol apresentem potencial citotóxico sobre a linhagem tumoral de câncer de mama testada, porém são necessários mais ensaios em linhagens de células não tumorais para averiguar se os extratos e/ou os NADES não são tóxicas a estas, além de ensaios para verificar a ação antiproliferativa dos extratos e dos solventes naturais.

APÊNDICES

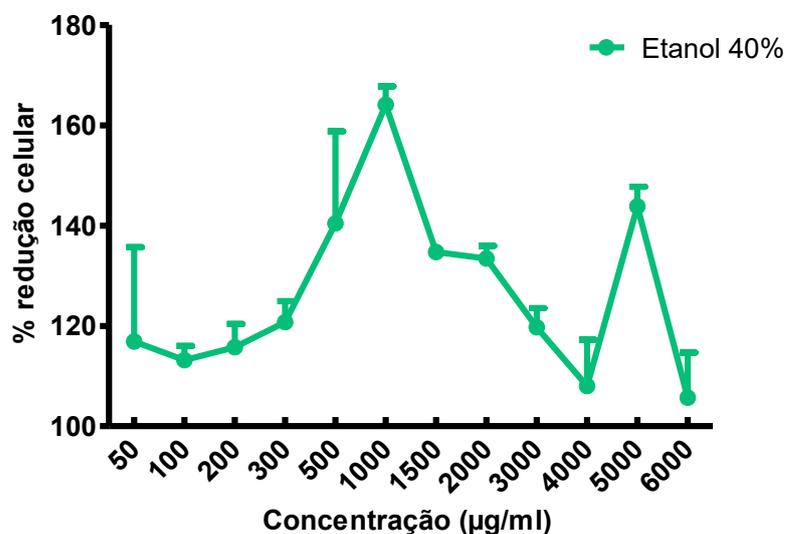


Figura Suplementar 4. 1. Atividade citotóxica do extrato hidroetanólico com compostos fenólicos na redução celular de linhagem tumoral MCF-7.

Tabela Suplementar 4. 1. Média e desvio padrão da porcentagem de redução de células MCF-7 sobre os extratos hidroetanólico, extrato AL:G, CC:GL e NADES AL:G, CC:GL

Concentração (µg/mL)	Etanol (40%)	Extrato AL:G	NADES AL:G	Extrato CC:GL	NADES CC:GL
50	116,89 ± 23,02	99,22 ± 0,86	123,73 ± 25,04	125,02 ± 18,81	126,02 ± 28,06
100	113,19 ± 3,46	101,50 ± 4,96	147,54 ± 5,19	139,42 ± 2,57	152,25 ± 6,30
200	115,75 ± 5,69	101,64 ± 9,08	159,09 ± 0,86	148,11 ± 21,61	161,65 ± 11,21
300	120,74 ± 5,14	104,63 ± 6,08	127,58 ± 21,90	134,14 ± 22,89	122,17 ± 30,32
500	140,41 ± 22,49	117,32 ± 9,08	150,96 ± 7,46	115,89 ± 11,55	114,94 ± 7,73
1000	164,08 ± 4,53	110,48 ± 1,78	118,46 ± 27,68	104,21 ± 3,56	112,76 ± 2,02
1500	134,72 ± 1,40	107,57 ± 8,78	103,76 ± 13,92	105,49 ± 10,40	104,33 ± 12,58
2000	133,45 ± 3,08	97,28 ± 8,32	100,87 ± 3,08	104,22 ± 2,60	87,93 ± 6,54
3000	119,70 ± 4,68	107,68 ± 10,74	79,61 ± 2,46	93,70 ± 14,32	90,58 ± 20,69
4000	108,03 ± 11,31	71,75 ± 47,22	67,71 ± 34,03	91,16 ± 4,85	99,94 ± 19,46
5000	143,85 ± 4,82	34,20 ± 4,02	88,73 ± 26,21	111,61 ± 3,18	92,55 ± 4,09
6000	105,72 ± 10,94	18,95 ± 2,03	43,79 ± 32,31	88,27 ± 6,06	82,15 ± 5,58

CONCLUSÃO

O NADES constituído de ácido orgânico obteve mais afinidade na extração dos compostos fenólicos do farelo desengordurado de girassol, esta capacidade foi confirmada pela identificação e quantificação por HPLC. No NADES formado por cloreto de colina:glicerol (1:1), por possuir menor A_w , a degradação a luz foi melhor observada. De forma preliminar, tanto o NADES puro de ácido láctico:glicose (5:1), quanto o extrato fenólico obtido a partir desse resultaram em maior redução da viabilidade celular.

Como perspectivas futuras estão a avaliação da estabilidade ao calor em temperaturas $\geq 100^\circ\text{C}$ e o uso dos NADES como meio para hidrólise enzimática do farelo de girassol. Nos ensaios celulares, a atividade citotóxica em linhagens não tumorais e o ensaio de exclusão de azul de tripan.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, A. P. et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. **Chemical Communications**, n. 1, p. 70–71, 19 dez. 2003.
- ACOSTA-ESTRADA, B. A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, v. 152, p. 46–55, jun. 2014.
- AGOSTINI-COSTA, T. DA S. Bioactive compounds and health benefits of some palm species traditionally used in Africa and the Americas – A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 224, p. 202–229, out. 2018.
- AHMAD, I. et al. Application of Natural Deep Eutectic Solvent-Based Ultrasonic Assisted Extraction of Total Polyphenolic and Caffeine Content from Coffe Beans (*Coffea Beans L.*) For Instant Food Products. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, p. 138–143, ago. 2018.
- AHMADI, R. et al. Assessment of cytotoxicity of choline chloride-based natural deep eutectic solvents against human HEK-293 cells: A QSAR analysis. **Chemosphere**, v. 209, p. 831–838, out. 2018.
- ALANÓN, M. E. et al. Choline chloride derivative-based deep eutectic liquids as novel green alternative solvents for extraction of phenolic compounds from olive leaf. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 1685–1701, jan. 2020.
- AL-NASIRY, S. et al. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. **Human Reproduction**, v. 22, n. 5, p. 1304–1309, 1 maio 2007.
- ALU'DATT, M. H. et al. A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 218, p. 99–106, mar. 2017.
- AMAKURA, Y. Isolation of phenolic constituents and characterization of antioxidant markers from sunflower (*Helianthus annuus*) seed extract. **Phytochemistry Letters**, p. 4, 2013.
- ARRUTIA, F. et al. Oilseeds beyond oil: Press cakes and meals supplying global protein requirements. **Trends in Food Science & Technology**, v. 100, p. 88–102, jun. 2020.
- AYDEMIR, T.; BECERIK, S. Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Extracts from *Ocimum Basilicum*, *Apium Graveolens* and *Lepidium Sativum* Seeds. **Journal of Food Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 62–79, 2011.
- BAJAJ, Y. P. S. (ED.). **Legumes and Oilseed Crops I**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1990. v. 10
- BAJKACZ, S.; ADAMEK, J. Evaluation of new natural deep eutectic solvents for the extraction of isoflavones from soy products. **Talanta**, v. 168, p. 329–335, jun. 2017.
- BALANDRÁN-QUINTANA, R. R. et al. Plant-Based Proteins. In: **Proteins: Sustainable Source, Processing and Applications**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 97–130.

- BALARAMAN, H. B.; SIVASUBRAMANIAM, A.; RATHNASAMY, S. K. High selective purification of Quercetin from Peanut hull using protic deep eutectic mixture based liquid–liquid microextraction. **Microchemical Journal**, v. 152, p. 104444, jan. 2020.
- BARBIERI, J. B. et al. Deep eutectic solvents applied in the extraction and stabilization of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) phenolic compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 144, p. 112049, fev. 2020.
- BARROS, A. A. et al. Green solvents for enhanced impregnation processes in biomedicine. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 5, p. 82–87, jun. 2017.
- BARTHET, V. J.; DAUN, J. K. Seed Morphology, Composition, and Quality. In: **Canola**. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 119–162.
- BOLCA, S. Bioavailability of Soy-Derived Isoflavones and Human Breast Cancer. In: **Polyphenols in Human Health and Disease**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 1241–1256.
- BONNIER, F. et al. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 1, p. 124–131, 2015.
- BUDZIK, M. P. et al. Clinicopathological characteristics of metaplastic breast cancer – analysis of the basic immunohistochemical profile and comparison with other invasive breast cancer types. **The Breast**, v. 43, p. 135–141, fev. 2019.
- CALDAS, T. W. et al. Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 86–91, jan. 2018.
- CHANG, A. S.; SREEDHARAN, A.; SCHNEIDER, K. R. Peanut and peanut products: A food safety perspective. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 296–303, jul. 2013.
- CHANG, S. H. An overview of empty fruit bunch from oil palm as feedstock for bio-oil production. **Biomass and Bioenergy**, v. 62, p. 174–181, mar. 2014.
- CHANG, S. K. et al. Nuts and their co-products: The impact of processing (roasting) on phenolics, bioavailability, and health benefits – A comprehensive review. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 88–122, out. 2016.
- CHANIOTI, S.; TZIA, C. Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 48, p. 228–239, ago. 2018.
- CHENG, A.-W. et al. Effects of storage time and temperature on polyphenolic content and qualitative characteristics of freeze-dried and spray-dried bayberry powder. **LWT**, v. 78, p. 235–240, maio 2017.
- CHOI, Y. H. 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, ago. 2011.

CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Green solvents for the extraction of bioactive compounds from natural products using ionic liquids and deep eutectic solvents. **Current Opinion in Food Science**, v. 26, p. 87–93, abr. 2019.

CHRIST-RIBEIRO, A. et al. Compostos fenólicos extraídos de fontes naturais aplicados como conservadores em massas de pizza. **Revista de Ciência e Inovação**, v. 1, n. 1, p. 129–138, 23 maio 2016.

CHUDHARY, Z. et al. Walnut. In: **Medicinal Plants of South Asia**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 671–684.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1033–1043, 15 maio 2000.

CONAB. **Acompanhamento de grãos da safra brasileira**, 2020. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>>

CRAVEIRO, R. et al. Properties and thermal behavior of natural deep eutectic solvents. **Journal of Molecular Liquids**, v. 215, p. 534–540, mar. 2016.

CRISOSTO, C. H.; FERGUSON, L.; NANOS, G. Olive (*Olea europaea* L.). In: **Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits**. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 63–87e.

CULL, S. G. et al. Room-temperature ionic liquids as replacements for organic solvents in multiphase bioprocess operations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 69, n. 2, p. 227–233, 20 jul. 2000.

CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O. Extraction techniques with deep eutectic solvents. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 105, p. 225–239, ago. 2018.

CVETANOVIĆ, A. Extractions Without Organic Solvents: Advantages and Disadvantages. **Chemistry Africa**, v. 2, n. 3, p. 343–349, set. 2019.

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

DAI, Y. et al. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. **Food Chemistry**, v. 187, p. 14–19, nov. 2015.

DAI, Y. 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, fev. 2016.

DAI, Y.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). **Food Chemistry**, v. 159, p. 116–121, set. 2014.

DESREUX, J. A. C. Breast cancer screening in young women. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 230, p. 208–211, nov. 2018.

DHANASEKARAN, S.; JAGANATHAN, R. Augmented Cell Signaling by Natural Polyphenols and Flavonoids: Insights Into Cancer Cell Remodeling and Prevention. In: **Studies in Natural Products Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2018. v. 58p. 213–244.

DO PRADO, A. C. P.; BLOCK, J. M. Palm and Palm Kernel Oil Production and Processing in Brazil. In: **Palm Oil**. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 251–274.

DUNFORD, N. T.; MARTÍNEZ, E. F.; SALAS, J. J. **Sunflower: chemistry, production, processing, and utilization**. 1. ed. [s.l.] AOCS Press/Academic Press, 2015.

EL KANTAR, S. et al. Green extraction of polyphenols from grapefruit peels using high voltage electrical discharges, deep eutectic solvents and aqueous glycerol. **Food Chemistry**, v. 295, p. 165–171, out. 2019.

ESFAHLAN, A. J.; JAMEI, R.; ESFAHLAN, R. J. The importance of almond (*Prunus amygdalus* L.) and its by-products. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 349–360, maio 2010.

FAO. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 5 jun. 2020.

FERNÁNDEZ, M. DE LOS Á. et al. Novel approaches mediated by tailor-made green solvents for the extraction of phenolic compounds from agro-food industrial by-products. **Food Chemistry**, v. 239, p. 671–678, jan. 2018a.

FERNÁNDEZ, M. DE LOS Á. et al. Natural deep eutectic solvents-mediated extractions: The way forward for sustainable analytical developments. **Analytica Chimica Acta**, v. 1038, p. 1–10, dez. 2018b.

FERNÁNDEZ-PRIOR, M. Á. et al. Deep eutectic solvents improve the biorefinery of alperujo by extraction of bioactive molecules in combination with industrial thermal treatments. **Food and Bioproducts Processing**, v. 121, p. 131–142, maio 2020.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 73, p. 627–650, 4 jan. 1927.

FU, N. et al. Environmentally friendly and non-polluting solvent pretreatment of palm samples for polyphenol analysis using choline chloride deep eutectic solvents. **Journal of Chromatography A**, v. 1492, p. 1–11, abr. 2017.

GAN, R.-Y. et al. Bioactive compounds and bioactivities of germinated edible seeds and sprouts: An updated review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 59, p. 1–14, 1 jan. 2017.

GAO, C. et al. Extraction and preliminary purification of polysaccharides from *Camellia oleifera* Abel. seed cake using a thermoseparating aqueous two-phase system based on EOPO copolymer and deep eutectic solvents. **Food Chemistry**, v. 313, p. 126164, maio 2020.

GARCÍA, A. et al. Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESS). **Food Chemistry**, v. 197, p. 554–561, abr. 2016.

- GARCIA-GARCIA, G.; STONE, J.; RAHIMIFARD, S. Opportunities for waste valorisation in the food industry – A case study with four UK food manufacturers. **Journal of Cleaner Production**, v. 211, p. 1339–1356, fev. 2019.
- GENTIL, R. M.; SERRA, J. C. V.; CASTRO, R. B. DE. Resíduos sólidos orgânicos provenientes da extração de oleaginosas para biodiesel e seus potenciais de uso. **Geoambiente On-line**, n. 18, p. 01-16 pág., 23 ago. 2012.
- GHATAK, S. K.; SEN, K. Peanut proteins: Applications, ailments and possible remediation. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 369–374, mar. 2013.
- GONÇALVES, A. C. et al. Sweet Cherry Phenolic Compounds: Identification, Characterization, and Health Benefits. In: **Studies in Natural Products Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2018. v. 59p. 31–78.
- GUNSTONE, F. **Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses**. Second edition ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2011.
- GUPTA, A.; BEHL, T.; PANICHAYUPAKARANAN, P. A review of phytochemistry and pharmacology profile of *Juglans regia*. **Obesity Medicine**, v. 16, p. 100142, dez. 2019.
- HAYYAN, M. et al. Natural deep eutectic solvents: cytotoxic profile. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, dez. 2016.
- HOLLAND, J. F.; FREI, E. **Cancer Medicine**. 9. ed. [s.l.: s.n.]. v. 1
- HOSSEINI, S. E.; WAHID, M. A. Utilization of palm solid residue as a source of renewable and sustainable energy in Malaysia. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 40, p. 621–632, dez. 2014.
- IARC. **Cancer today**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/>>. Acesso em: 25 abr. 2020a.
- IARC. **WORLD CANCER REPORT: cancer research for cancer development**. France: IARC, 2020b.
- INCA. **ABC do Câncer - Abordagens Básicas para o Controle do Câncer**. 5. ed. Rio de Janeiro: Mario Jorge Sobreira da Silva, 2019.
- ITOH, T.; KOO, Y.-M. (EDS.). **Application of Ionic Liquids in Biotechnology**. Cham: Springer International Publishing, 2019. v. 168
- JELIŃSKI, T.; PRZYBYŁEK, M.; CYSEWSKI, P. Natural Deep Eutectic Solvents as Agents for Improving Solubility, Stability and Delivery of Curcumin. **Pharmaceutical Research**, v. 36, n. 8, p. 116, 3 jun. 2019.
- JORDAN, V.; KHAN, M.; PRILL, D. Breast Cancer Screening. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, dez. 2018.
- KAL TSA, O. et al. Green Valorization of Olive Leaves to Produce Polyphenol-Enriched Extracts Using an Environmentally Benign Deep Eutectic Solvent. **AgriEngineering**, v. 2, n. 2, p. 226–239, 1 abr. 2020.

KARAMAN, S. et al. Recovery Potential of Cold Press Byproducts Obtained from the Edible Oil Industry: Physicochemical, Bioactive, and Antimicrobial Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 8, p. 2305–2313, 4 mar. 2015.

KARAMI, Z. et al. Optimization of microwave assisted extraction (MAE) and soxhlet extraction of phenolic compound from licorice root. **Journal of Food Science and Technology**, 30 abr. 2014.

KAREFYLLAKIS, D. et al. Physical bonding between sunflower proteins and phenols: Impact on interfacial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 73, p. 326–334, dez. 2017.

KHEZELI, T.; DANESHFAR, A.; SAHRAEI, R. A green ultrasonic-assisted liquid–liquid microextraction based on deep eutectic solvent for the HPLC-UV determination of ferulic, caffeic and cinnamic acid from olive, almond, sesame and cinnamon oil. **Talanta**, v. 150, p. 577–585, abr. 2016.

KHIR, R.; PAN, Z. Walnuts. In: **Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 391–411.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of Cell Viability by the alamarBlue Assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6, p. pdb.prot095489, jun. 2018.

KURKI, A.; BACHMANN, J.; HILL, H. Oilseed Processing for Small-Scale Producers. p. 12, 2008.

LAGUNA, O. et al. Production of proteins and phenolic compounds enriched fractions from rapeseed and sunflower meals by dry fractionation processes. **Industrial Crops and Products**, v. 118, p. 160–172, ago. 2018.

LIANG, S.; WERE, L. M. Chlorogenic acid induced colored reactions and their effect on carbonyls, phenolic content, and antioxidant capacity in sunflower butter cookies. **LWT**, v. 87, p. 16–22, jan. 2018.

LOMASCOLO, A. et al. Rapeseed and sunflower meal: a review on biotechnology status and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 5, p. 1105–1114, set. 2012.

LUNA-GUEVARA, MA. L. et al. Phenolic Compounds: A Good Choice Against Chronic Degenerative Diseases. In: **Studies in Natural Products Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2018. v. 59p. 79–108.

MARTINS, Z. E.; PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Food industry by-products used as functional ingredients of bakery products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, p. 106–128, set. 2017.

MBA, O. I.; DUMONT, M.-J.; NGADI, M. Palm oil: Processing, characterization and utilization in the food industry – A review. **Food Bioscience**, v. 10, p. 26–41, jun. 2015.

MENENDEZ, J. A. et al. Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin) in HER2-overexpressing breast cancer cells. **BMC cancer**, v. 7, p. 80, 9 maio 2007.

- MOKRANI, A.; MADANI, K. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. **Separation and Purification Technology**, v. 162, p. 68–76, abr. 2016.
- MÜHLBAUER, W.; MÜLLER, J. Peanut (*Arachis hypogaea* L.). In: **Drying Atlas**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 151–156.
- NEO, Y.-P. et al. Phenolic acid analysis and antioxidant activity assessment of oil palm (*E. guineensis*) fruit extracts. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 353–359, set. 2010.
- NIEDZWIECKI, A. et al. Anticancer Efficacy of Polyphenols and Their Combinations. **Nutrients**, v. 8, n. 9, p. 552, 9 set. 2016.
- NOLLET, L. M. L.; GUTIERREZ-URIBE, J. A. (EDS.). **Phenolic Compounds in Food: Characterization and Analysis**. 1. ed. Boca Raton : CRC Press, Taylor & Francis Group, 2018.: CRC Press, 2018.
- OLIVEIRA, D. M. DE; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051–1056, 2011.
- ORNELAS, L. H. **Técnica Dietética: seleção e preparo do alimentos**. 8° ed. [s.l.: s.n.].
- ORTS, A. et al. Protease technology for obtaining a soy pulp extract enriched in bioactive compounds: isoflavones and peptides. **Heliyon**, v. 5, n. 6, p. e01958, jun. 2019.
- OYENIHI, A. B.; SMITH, C. Are polyphenol antioxidants at the root of medicinal plant anti-cancer success? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 229, p. 54–72, jan. 2019.
- OZTURK, B.; PARKINSON, C.; GONZALEZ-MIQUEL, M. Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents. **Separation and Purification Technology**, v. 206, p. 1–13, nov. 2018.
- PAIVA, A. et al. Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 2, n. 5, p. 1063–1071, 5 maio 2014.
- PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 5, p. 270–278, 2009.
- PANIĆ, M. et al. Ready-to-use green polyphenolic extracts from food by-products. **Food Chemistry**, v. 283, p. 628–636, jun. 2019a.
- PANIĆ, M. et al. Enabling technologies for the extraction of grape-pomace anthocyanins using natural deep eutectic solvents in up-to-half-litre batches extraction of grape-pomace anthocyanins using NADES. **Food Chemistry**, v. 300, p. 125185, dez. 2019b.
- PARADISO, V. M. et al. Towards green analysis of virgin olive oil phenolic compounds: Extraction by a natural deep eutectic solvent and direct spectrophotometric detection. **Food Chemistry**, v. 212, p. 43–47, dez. 2016.
- PARADISO, V. M. et al. An easy and green tool for olive oils labelling according to the contents of hydroxytyrosol and tyrosol derivatives: Extraction with a natural deep eutectic solvent and direct spectrophotometric analysis. **Food Chemistry**, v. 291, p. 1–6, set. 2019.

- PEDROSA, M. M. et al. Determination of caffeic and chlorogenic acids and their derivatives in different sunflower seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 4, p. 459–464, 2000.
- PICKARDT, C. et al. Processing of low polyphenol protein isolates from residues of sunflower seed oil production. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1417–1424, 2011.
- PRATAP, A. et al. Soybean. In: **Breeding Oilseed Crops for Sustainable Production**. [s.l.: s.n.].
- RABONATO, L. C. et al. EXTRAÇÃO DE ÓLEO DE AMÊNDOAS DE GIRASSOL ALTO OLÉICO POR PRENSAGEM A FRIO. p. 6, 2016.
- RADOŠEVIĆ, K. et al. Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. **LWT**, v. 73, p. 45–51, nov. 2016.
- RAMACHANDRAN, S. et al. Oil cakes and their biotechnological applications – A review. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 10, p. 2000–2009, jul. 2007.
- RENARD, C. M. G. C. Extraction of bioactives from fruit and vegetables: State of the art and perspectives. **LWT**, v. 93, p. 390–395, jul. 2018.
- ROCCHETTI, G. et al. Impact of conventional/non-conventional extraction methods on the untargeted phenolic profile of Moringa oleifera leaves. **Food Research International**, v. 115, p. 319–327, jan. 2019.
- RODRIGUES, F.; PIMENTEL, F. B.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Olive by-products: Challenge application in cosmetic industry. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 116–124, ago. 2015.
- ROVER, M. R.; BROWN, R. C. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin–Ciocalteu method. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 104, p. 366–371, nov. 2013.
- RUESGAS-RAMÓN, M.; FIGUEROA-ESPINOZA, M. C.; DURAND, E. Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 18, p. 3591–3601, 10 maio 2017.
- SÁNCHEZ-TENA, S. et al. Green tea phenolics inhibit butyrate-induced differentiation of colon cancer cells by interacting with monocarboxylate transporter 1. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 12, p. 2264–2270, dez. 2013.
- SCHANES, K.; DOBERNIG, K.; GÖZET, B. Food waste matters - A systematic review of household food waste practices and their policy implications. **Journal of Cleaner Production**, v. 182, p. 978–991, maio 2018.
- SENKOYLU, N.; DALE, N. Sunflower meal in poultry diets: a review. **World's Poultry Science Journal**, v. 55, n. 2, p. 153–174, 1 jun. 1999.

SERVILI, M. et al. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1–2, p. 113–127, out. 2004.

SHABANI, E. et al. Deep eutectic solvents (DES) as green extraction media for antioxidants electrochemical quantification in extra-virgin olive oils. **Talanta**, v. 215, p. 120880, ago. 2020.

SHANG, X. et al. Tailor-made natural deep eutectic solvents for green extraction of isoflavones from chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts. **Industrial Crops and Products**, v. 140, p. 111724, nov. 2019.

SILVA, J. M. M. et al. Design of functional therapeutic deep eutectic solvents based on choline chloride and ascorbic acid. p. 29, 2018.

SILVA, M. L. C. et al. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669–682, 1 set. 2010.

SINGH, B. et al. Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. **Food Research International**, v. 101, p. 1–16, nov. 2017.

SIRACUSA, L.; RUBERTO, G. Not Only What Is Food Is Good—Polyphenols From Edible and Nonedible Vegetable Waste. In: **Polyphenols in Plants**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 3–21.

SMITH, E. L.; ABBOTT, A. P.; RYDER, K. S. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 21, p. 11060–11082, 12 nov. 2014.

SOCAS-RODRÍGUEZ, B. et al. Deep eutectic solvents. In: **Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 123–177.

STOTT, P. Transdermal delivery from eutectic systems: enhanced permeation of a model drug, ibuprofen. **Journal of Controlled Release**, v. 50, n. 1–3, p. 297–308, 2 jan. 1998.

SUCHOSZEK-ŁUKANIUK, K. et al. Health Benefits of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Seeds and Peanut Oil Consumption. In: **Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention**. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 873–880.

SYAHDI, R. R. et al. Application of green extraction methods to resveratrol extraction from peanut (*Arachis hypogaea* l.) Skin. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, p. 38–42, 13 mar. 2020.

TAHA, F. et al. Optimization of the Extraction of Total Phenolic Compounds from Sunflower Meal and Evaluation of the Bioactivities of Chosen Extracts. **American Journal of Food Technology**, v. 6, p. 1002–1020, 1 dez. 2011.

TAN, Y. T.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M. Evaluation of fractionation and delignification efficiencies of deep eutectic solvents on oil palm empty fruit bunch. **Industrial Crops and Products**, v. 123, p. 271–277, nov. 2018.

THRANE, M. et al. Soy Protein: Impacts, Production, and Applications. **Sustainable Protein Sources**, p. 23–45, 1 jan. 2017.

TUNCHAIYAPHUM, S.; ESHTIAGHI, M. N.; YOSWATHANA, N. Extraction of Bioactive Compounds from Mango Peels Using Green Technology. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, p. 194–198, 2013.

USDA. **World Agricultural Production | USDA Foreign Agricultural Service**. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/data/world-agricultural-production>>. Acesso em: 2 fev. 2019a.

USDA. **Tree Nuts Production | USDA Foreign Agricultural Service**. Disponível em: <<https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/tm70mv16z/jm2155639/sq87c996m/TreeNuts.pdf>>. Acesso em: 1 jun. 2020b.

VANDA, H. et al. Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents. **Comptes Rendus Chimie**, v. 21, n. 6, p. 628–638, jun. 2018.

VICHAPONG, J. et al. High performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds and their antioxidant activities in rice varieties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 9, p. 1325–1330, 2010.

VIEIRA, V. et al. Enhanced extraction of phenolic compounds using choline chloride based deep eutectic solvents from *Juglans regia* L. **Industrial Crops and Products**, v. 115, p. 261–271, maio 2018.

VILKOVÁ, M.; PŁOTKA-WASYLKA, J.; ANDRUCH, V. The role of water in deep eutectic solvent-base extraction. **Journal of Molecular Liquids**, v. 304, p. 112747, abr. 2020.

WANASUNDARA, J. P. D. et al. Proteins From Canola/Rapeseed. In: **Sustainable Protein Sources**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 285–304.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 6, p. 300–312, jun. 2006.

WANG, X. et al. Validation of spectrophotometric determination of chlorogenic acid in fermentation broth and fruits. **Food Chemistry**, v. 278, p. 170–177, abr. 2019.

WEISZ, G. M.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Sustainable sunflower processing — II. Recovery of phenolic compounds as a by-product of sunflower protein extraction. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 17, p. 169–179, 1 jan. 2013.

WEISZ, G. M.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R. Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MSn. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 758–765, jul. 2009.

WILDERMUTH, S. R.; YOUNG, E. E.; WERE, L. M. Chlorogenic Acid Oxidation and Its Reaction with Sunflower Proteins to Form Green-Colored Complexes: Chlorogenic acid oxidation.... **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 5, p. 829–843, set. 2016.

WONGSIRICHOT, P.; GONZALEZ-MIQUEL, M.; WINTERBURN, J. Holistic valorization of rapeseed meal utilizing green solvents extraction and biopolymer production with *Pseudomonas putida*. **Journal of Cleaner Production**, v. 230, p. 420–429, set. 2019.

YADA, S.; LAPSLEY, K.; HUANG, G. A review of composition studies of cultivated almonds: Macronutrients and micronutrients. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 4–5, p. 469–480, jun. 2011.

ZARDO, I. et al. Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Sunflower Seed Cake Using Response Surface Methodology. **Waste and Biomass Valorization**, 5 ago. 2017.

ZHOU, J. et al. Phenolic profiles, antioxidant activities and cytoprotective effects of different phenolic fractions from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) fruits treated by ultra-high pressure. **Food Chemistry**, v. 288, p. 68–77, ago. 2019.

ZOUMPOULAKIS, P. et al. Evaluating Modern Techniques for the Extraction and Characterisation of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Seeds Phenolics. **Antioxidants**, v. 6, n. 3, p. 46, 24 jun. 2017.

ZUROB, E. et al. Design of natural deep eutectic solvents for the ultrasound-assisted extraction of hydroxytyrosol from olive leaves supported by COSMO-RS. **Separation and Purification Technology**, v. 248, p. 117054, out. 2020.