



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2015

**Selesa Vanessa
Shabudin**

**Extração de ácidos triterpénicos a partir da
casca de Eucalipto utilizando líquidos iónicos**



**Selesa Vanessa
Shabudin**

**Extração de ácidos triterpénicos a partir da
casca de Eucalipto utilizando líquidos iónicos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo de Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica do Doutor Armando Jorge Domingues Silvestre, Professor Associado com Agregação do Departamento Química da Universidade de Aveiro, e da Doutora Mara Guadalupe Freire Martins, Investigadora Coordenadora no Departamento de Química, CICECO, da Universidade de Aveiro.

Aos meus pais e amigos...

O júri

Presidente

Prof.^a Doutora Rita Maria Pinho Ferreira
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Armando Jorge Domingues Silvestre
Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Jorge Fernando Brandão Pereira
Professor Doutor Assistente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Brasil

Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer ao meu orientador, Prof. Armando Silvestre, não só pelo extraordinário acompanhamento ao longo deste trabalho mas também, pela disposição, sorrisos, conselhos e por me ter dado a possibilidade de crescer a nível profissional. Seguidamente quero agradecer à minha co-orientadora, Prof Mara, pelo apoio, disponibilidade, simpatia que proporcionou ao longo desta minha jornada. Foi um privilégio e uma oportunidade fantástica de desenvolver a minha tese neste ambiente, obrigado por terem acreditado em mim e por todo o esforço. Se tivesse que voltar atrás, sem dúvida que escolheria a mesma tese e os mesmos orientadores. Um especial obrigada à Filipa por ser a pessoa mais cheia de luz, pelo sorriso contagiante e por ter estado sempre presente, preocupada e acima de tudo, pela tua amizade e força que foram fundamentais tanto a nível pessoal como profissional. Obrigada por me fazeres sentir ‘forte’ e por aqueles abraços que me faziam sentir tão especial. Um obrigado de igual modo à Emanuelle, por todo o carinho, abraços e pelas palavras sábias. Obrigada meninas por todo o apoio, por toda a paciência, gosto muito de vocês. Ao Path e ao mini-Path, por me terem acolhido tão bem e por me deixarem sentir que fiz parte desse grupo. Obrigada ainda a todos os amigos, que fizeram parte desta caminhada, que partilharam os bons e os maus momentos e que me fizeram sempre sorrir. Um grande obrigado ao Prof Fernando Domingues e Mónica Válega pela disponibilidade e pela confiança de trabalhar com o HPLC, pelas brincadeiras, conversas e gargalhadas.

Um especial obrigado à minha melhor amiga Diana, mais uma vez agradeço-te por confiares tanto em mim, por aturares os meus maus humores e por me fazeres sempre acreditar que sou capaz de fazer sempre mais. Obrigada por todos os dias mandares aquela mensagem que me faz sentir tão especial. Um grande obrigado ao meu namorado pelas ricas palavras nos meus momentos de desespero ‘se o Cristiano Ronaldo conseguiu, tu consegues, *nothing is impossible*’.

Mãe obrigada por tornares o meu sonho possível, por todo o apoio, compreensão, amor e pela Mulher que és. Obrigada por toda a lição de vida e por me tornares pessoa que sou hoje. Além disso, agora posso te ajudar na tua investigação/extração da babosa. Obrigada pai por me fazeres sentir sempre a melhor pessoa do mundo e pelas intensas conversas no Skype. Obrigada por, apesar de estares longe, estares sempre comigo.

Palavras-chave Biorrefinaria, *E. globulus*, casca externa, ácidos triterpénicos, extração, solubilidade, líquidos iónicos, surfactantes.

Resumo Os recursos renováveis têm sido um forte alvo de investigação científica nos últimos anos, onde o aproveitamento de biomassa e seus resíduos para a obtenção de compostos de valor acrescentado, combustíveis e energia têm sido abordados no conceito de biorrefinaria integrada. As indústrias de papel geram quantidades significativas de resíduos, nomeadamente a casca de eucalipto que é atualmente queimada para a geração de energia. De forma a valorizar este resíduo, a presente dissertação teve como objetivo extrair compostos triterpénicos, a partir casca externa de *Eucalyptus globulus*, utilizando solventes de extração alternativos - soluções aquosas de líquidos iónicos (LIs) – para substituir os solventes orgânicos actualmente utilizados. Os ácidos triterpénicos apresentam um elevado interesse na indústria cosmética, farmacêutica e alimentar graças às suas propriedades anti-inflamatórias, antitumorais, entre outras. Primeiramente, caracterizou-se a casca externa de *Eucalyptus globulus*, e posteriormente procedeu-se ao estudo de solubilidade de ácido ursólico (AU, utilizado como molécula modelo) a 25 °C em soluções aquosas de LIs e surfactantes de modo a seleccionar os solventes mais eficientes para a extração. Deste trabalho conclui-se que a capacidade surfactante das soluções aquosas de LIs, particularmente [C₄C₁im][C₈H₁₇SO₄], [C₁₆C₁im]Cl e [C₁₄C₁im]Cl, desempenham um papel fundamental para a solubilização de AU em água, podendo aumentar quase 16000 vezes a sua solubilidade, e permitiu recuperar cerca de 89% deste composto com simples adição de água como anti-solvente. Por fim, compararam-se as quantidades de ácidos triterpénicos extraídas a partir da casca de eucalipto com soluções aquosas de [C₁₄C₁im]Cl, metanol e com extração em soxhlet com diclorometano.

Keywords

Biorefinery, industry of paper pulp, *E. globulus*, outer bark, triterpenic acids, ionic liquids, surfactants.

Abstract

Renewable resources have been a hot topic of research, in which the use biomass to obtain high-value compounds, fuels and energy has been addressed within an integrated biorefinery concept. Paper industries generate significant amounts of waste, in particular, in outer barks of eucalyptus that is currently burned to generate energy. In order to add value to this residue, the objective of this thesis consisted on the extraction of triterpenic compounds from the outer bark of *Eucalyptus globulus*, using alternative and more benign extraction solvents – aqueous solutions of ionic liquids (ILs) – to replace the commonly used volatile organic solvents. Triterpenic acids display a high interest o in the cosmetic, pharmaceutical and food industries due to their anti-inflammatory and antitumoral properties. The characterization of the outer bark of *Eucalyptus globulus* was firstly addressed followed by a study on the solubility of ursolic acid (AU, used as model molecule) at 25°C in aqueous solutions of ILs and conventional surfactants in order to select the most efficient solvents for the extraction from biomass. It can be concluded that the surfactant capacity of aqueous solutions of ILs, particularly [C₄C₁im][C₈H₁₇SO₄], [C₁₆C₁im]Cl and [C₁₄C₁im]Cl, plays a key role for the AU solubilization in water, leading to an increase of almost 16,000 times in solubility and allows to recover approximately 89% of the compound by a simple addition of water as anti-solvent. Finally, the amounts of triterpene acids extracted from the outer bark of *Eucalyptus globulus* with aqueous solutions of [C₁₄C₁im]Cl, methanol and a Soxhlet extraction with dichloromethane were determined and compared.

Índice

LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
LISTA DE LÍQUIDOS IÔNICOS	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS	3
1.2. IMPORTÂNCIA DA BIOMASSA VEGETAL COMO FONTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS	3
1.3. CONCEITO DE BIORREFINARIA	4
1.4. O <i>EUCALYPTUS GLOBULUS</i> NAS INDÚSTRIAS DE PASTA DE PAPEL	5
1.4.1. EXPLORAÇÃO DE <i>E. GLOBULUS</i> NAS INDÚSTRIAS DE PASTA DE PAPEL DENTRO DO CONTEXTO BIORREFINARIA	6
1.5. COMPOSTOS LIPOFÍLICOS PRESENTES NA CASCA EXTERNA DE <i>EUCALYPTUS</i> <i>GLOBULUS</i> E AS SUAS PROPRIEDADES.	7
1.5.1. <i>Metabolismo primário e secundário das plantas</i>	7
1.5.2. <i>Extrátaveis lipofílicos da casca externa do E. globulus</i>	8
1.5.3. <i>Terpenos e terpenóides e sua biossíntese</i>	10
1.5.3.1. TRITERPENÓIDES PENTACÍCLICOS	13
1.5.4. <i>Triterpenos e atividade biológica</i>	14
1.6. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS TRITERPÊNICOS A PARTIR DA CASCA DE EUCALIPTO	16
1.7. LÍQUIDOS IÔNICOS	16
2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	21
2.1. AMOSTRAS E REAGENTES	23
2.1.1. COLHEITA DA CASCA EXTERNA DE <i>E. GLOBULUS</i>	23
2.1.2. REAGENTES	23
2.2. CARACTERIZAÇÃO DA CASCA EXTERNA DE <i>EUCALYPUS GLOBULUS</i>	25
2.2.1. <i>Teor de humidade</i>	25
2.2.2. <i>Caracterização da casca externa de E. globulus por GC-MS</i>	25
2.3. QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS TRITERPÊNICOS POR HPLC-UV	26
2.3.1. <i>Condições cromatográficas</i>	26
2.3.2. <i>Curvas de calibração dos ácidos ursólico, oleanólico e betulínico</i>	26

2.4. SOLUBILIDADE DO ÁCIDO URSÓLICO EM SOLUÇÕES AQUOSAS DE LIS E SURFACTANTES CONVENCIONAIS	27
2.4.1. CMC dos Lis estudados	28
2.5. EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS TRITERPÊNICOS DA CASCA DE EUCALIPTO	29
2.6. MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO (SEM)	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1. CARACTERIZAÇÃO DA CASCA EXTERNA DE <i>E. GLOBULUS</i>	33
3.2. VALIDAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS TRITERPÊNICOS POR HPLC-UV	38
3.3. SOLUBILIDADE DO ÁCIDO URSÓLICO	41
3.3.1. Efeito da estrutura dos líquidos iónicos de cadeia alquílica curta	41
3.3.2. Efeito da concentração e da estrutura dos líquidos iónicos de cadeia alquílica longa.....	43
3.3.3. Comparação da solubilidade do ácido ursólico em soluções de surfactantes convencionais e soluções aquosas de líquidos iónicos	48
3.4. RECUPERAÇÃO DO ÁCIDO URSÓLICO A PARTIR DE SOLUÇÕES AQUOSAS DE LÍQUIDOS IÓNICOS.....	50
3.5. EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS TRITERPÊNICOS A PARTIR DA CASCA EXTERNA DE <i>E. GLOBULUS</i> USANDO SOLUÇÕES AQUOSAS DE LÍQUIDOS IÓNICOS	51
3.6. MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO (SEM)	54
4. CONCLUSÃO FINAL	58
5. TRABALHO FUTURO	61
6. BIBLIOGRAFIA	65
7. ANEXOS	73

Lista de Figuras

Figura 1: Conceito de biorrefinaria em comparação com a refinaria de petróleo [Imagem adaptada de (12)].....	4
Figura 2: Distribuição da área total de Floresta por espécie dominante [Imagem adaptada de (15)].....	6
Figura 3: Possível abordagem para a exploração dos ácidos triterpênicos da casca de <i>E. globulus</i> integrada numa indústria de produção de pasta de papel.	7
Figura 4: Vias principais do metabolismo secundário das plantas [Imagem adaptada de (18)]. ..	8
Figura 5: Estrutura dos ácidos triterpênicos identificados na casca externa de <i>E. globulus</i> [Imagem adaptada de (2,4)].	9
Figura 6: Estrutura do Isopreno.....	10
Figura 7: Duas vias possíveis para a síntese de IPP (isopentenil difosfato) e DMAPP (dimetilalil difosfato): Via Mevalonato (MVA) e via 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP) ou 2-C-Metil-D-Eritrol-4-fosfato (MEP) [adaptado de (7)].	12
Figura 8: Biossíntese dos triterpenóides pentacíclicos.....	13
Figura 9: Estruturas químicas de alguns catiões e aniões de líquidos iônicos.	17
Figura 10: Estrutura química dos catiões e aniões que compõem os líquidos iônicos [A] e dos surfactantes convencionais [B] usados neste trabalho.	24
Figura 11: Placa de aquecimento/agitação utilizada nas extrações.....	29
Figura 12: Extração em <i>soxhlet</i> com CH ₂ Cl ₂ da casca externa de <i>E. globulus</i>	33
Figura 13: Cromatogramas dos extratos: [A] da casca externa 1 e [B] da casca externa 2 (ácidos gordos, AG; álcoois alifáticos de cadeia longa, AACL e ácidos triterpênicos,TTs).....	35
Figura 14: Espectro de massa dos ácidos triterpênicos: [A] ácido ursólico, [B] ácido oleanólico e [C] ácido betulínico.....	37
Figura 15: Espectro de absorção do AU em metanol na região UV.	39
Figura 16: Dissolução de AU em soluções aquosas de LIs de: [A] [C ₄ C ₁ im][TOS] e [B] [C ₈ C ₁ im]Cl.	43
Figura 17: Influência da concentração e da estrutura dos líquidos iônicos sobre a solubilidade do ácido ursólico à temperatura de 25 °C.....	44
Figura 18: Aspeto gelatinoso das soluções aquosas de [C ₁₈ C ₁ im]Cl a 250 e 500 mM	45
Figura 19: Estrutura molecular do cloreto de 1-metil-3-tetradecilimidazólio ([C ₁₄ C ₁ im]Cl).	45
Figura 20: Influência da cadeia alquílica na formação de agregados micelares	47
Figura 21: Exemplo de alguns agregados micelares: [A] [C ₄ mim][C ₈ H ₁₇ SO ₄] e [B] [C ₁₆ C ₁ im]Cl.	47

Figura 22: Solubilidade do ácido ursólico utilizando soluções aquosas dos de líquidos iônicos a uma concentração de 500 mM (à exceção do [C ₁₈ C ₁ im]Cl, a 150 mM) e o respetivo pH.	48
Figura 23: Solubilidade de AU em soluções aquosas de líquidos iônicos e surfactantes convencionais a 25°C.	49
Figura 24: Ácido ursólico dissolvido numa solução aquosa de [C ₄ C ₁ im][C ₈ H ₁₇ SO ₄] a 250 mM e, formação de um precipitado resultante da adição de água.	50
Figura 25: Rendimentos de extração obtidos por: [A] soxhlet com diclorometano, e [B] ácido betulínico (AB) e [C] ácido ursólico (AU) a partir da casca de eucalipto 2 utilizando uma solução aquosa de [C ₁₄ C ₁ im]Cl a 750 mM e metanol.	52
Figura 26: Rendimentos de extração de [A] ácido betulínico e [B] ácido ursólico a partir da casca de eucalipto com soluções aquosas de [C ₁₄ C ₁ im]Cl seguida de extração com metanol.	53
Figura 27: Imagens de SEM das amostras de casca [A] não sujeitadas a extração; após a extração com: [B] metanol, [C] solução aquosa de [C ₁₄ C ₁ im]Cl e [D] re-extração com metanol.	54

Lista de Tabelas

Tabela 1: Principais componentes triterpênicos identificados na casca externa da <i>E.globulus</i> (g /kg) (2).	10
Tabela 2: Preparação das soluções padrões.	27
Tabela 3: Teor de humidade e rendimentos de extração obtidos da casca externa de <i>E. globulus</i> . Os valores apresentam um desvio padrão associado resultante da análise de pelo menos duas réplicas.	33
Tabela 4: Identificação dos ácidos triterpênicos (mg/kg de casca) presentes no extrato obtido a partir da casca externa 2 e respetivos tempos de retenção e quantidades obtidas.	35
Tabela 5: Equação da curva de calibração do ácido ursólico (área <i>versus</i> concentração), coeficiente de correlação (R^2), limites de deteção (LOD) e quantificação (LOQ) e respetivo tempo de retenção.	40
Tabela 6: Resultados de precisão (% RSD), da exatidão (% ER) e tempos de retenção do ácido ursólico.....	40
Tabela 7: Média e desvio padrão dos tempos de retenção do ácido betulínico, oleanólico e ursólico para as soluções padrão em metanol.....	41
Tabela 8: Líquidos iónicos de cadeia curta estudados (em solução aquosa entre 750 e 1000 mM) na dissolução do UA.....	42
Tabela 9: Valores de condutividade reportados na literatura e obtidos experimentalmente, ambos foram determinados por condutividade a uma temperatura de 25 °C.	46
Tabela 10: Tempos de retenção do ácido betulínico e ácido ursólico.	52

Lista de abreviaturas

AB	Ácido betulínico
AO	Ácido oleanólico
AU	Ácido ursólico
Acetil-Coa	Acetil- Coenzima A
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CAT	Catalase
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CMC	Concentração micelar crítica
CTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamonio
DMAPP	Pirofosfato de dimetilalilo
DXP	1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato
<i>E. globulus</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>
<i>E. grandis</i>	<i>Eucalyptus grandis</i>
<i>E. maidenii</i>	<i>Eucalyptus maidenii</i>
<i>E. nitens</i>	<i>Eucalyptus nitens</i>
<i>E. urograndis</i>	<i>Eucalyptus urograndis</i>
ER	Erro relativo
EROS	Espécies reativas de oxigénio
EUA	Extração assistida por ultrassons
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FFPP	Pirofosfato de farnesilgeranilo
FGPP	Pirofosfato de geranilfarnesilo
FPP	Pirofosfato de farnesilo
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa
GGPP	Pirofosfato de geranilgeranilo
GPP	Pirofosfato de geranilo
GPx	Glutationa peroxidase
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IPP	Pirofosfato de isopentenilo
INOS	Óxido nítrico sintase induzida
<i>K</i>	Condutividade
LD	Limite de deteção
LIs	Líquidos iónicos

LQ	Limite de quantificação
MAE	Extração assistida por micro-ondas
MEP	2-C-Metil-D-Eritrol-4-fosfato
MHC	Concentração hidrotropica mínima
MMP-9	Metaloproteinase-9
MVA	Ácido mevalónico
NREL	Laboratório Nacional de Energia Renovável
Nrf2	Fator nuclear eritróide
PLA ₂	Enzima fosfolipase A ₂
R ²	Coefficiente de correlação
RSD	Desvio padrão relativo
SC-CO ₂	Dióxido de carbono supercrítico
SDBS	Dodecil benzeno sulfato de sódio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SLE	Extração sólido-líquido
SOD	Superóxido dismutase
<i>T</i>	Temperatura
TFA	Ácido trifluoracético
TMSCl	Trimetilclorossilano
UV-vis	Ultravioleta-visível
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>

Lista de Líquidos iónicos

[C ₂ C ₁ im][CH ₃ CO ₂]	Acetato de 1-etil-3-metilimidazólio
[C ₈ C ₁ im]Cl	Cloreto de 1-metil-3-octilimidazólio
[C ₁₀ C ₁ im]Cl	Cloreto de 1-decil-3-metilimidazólio
[C ₁₂ C ₁ im]Cl	Cloreto de 1-dodecil-3-metilimidazólio
[C ₁₄ C ₁ im]Cl	Cloreto de 1-metil-3-tetradecilmetilimidazólio
[C ₁₆ C ₁ im]Cl	Cloreto de 1-hexadecil-3-metilimidazólio
[C ₁₈ C ₁ im]Cl	Cloreto de 1- metil-3- octadecilimidazólio
[C ₄ C ₁ im][SCN]	Tiocianato de 1-butil-3-metilimidazólio
[C ₄ C ₁ im][TOS]	Tosilato de 1-butil-3-metilimidazólio
[C ₄ C ₁ im][C ₂ H ₅ SO ₄]	Etilsulfato de 1-butil-3-metilimidazólio
[C ₄ C ₁ im][C ₈ H ₁₇ SO ₄]	Octilsulfato de 1-butil-3-metilimidazólio
[C ₄ C ₁ im][N(CN) ₂]	Dicianamida de 1-butil-3-metilimidazólio
[C ₄ C ₁ py][N(CN) ₂]	Dicianamida de 1-butil-3-metilpiridínio
[C ₄ C ₁ pyrr]Cl	Cloreto de 1-butil-1-metilpirrolidínio
[P _{444,14}]Cl	Cloreto de tributiltetradecilfosfónio

1. Introdução

1.1. Motivação e objetivos

Nas últimas décadas, tem emergido um elevado interesse na exploração integrada dos recursos renováveis como fontes de bioprodutos, bioenergia e biocombustíveis dentro do conceito de biorrefinaria. As indústrias de pasta de papel têm atraído especial atenção, uma vez que geram quantidades significativas de resíduos de biomassa e subprodutos que são, atualmente, queimados para a produção de energia em vez de serem, primeiramente, valorizados através da extração prévia de compostos de elevado valor acrescentado (1,2). Alguns desses resíduos como, por exemplo, a casca externa de *E. globulus*, são particularmente ricos em ácidos triterpénicos (2,3). A fim de valorizar estes compostos, têm sido aplicadas extrações com dióxido de carbono supercrítico ou em Soxhlet com solventes orgânicos voláteis (4,5). Neste trabalho pretendem-se desenvolver técnicas de extração mais rápidas, benignas e sustentáveis para extrair estes compostos presentes na casca de eucalipto recorrendo a soluções aquosas de líquidos iónicos que surgem como uma alternativa ideal aos solventes orgânicos voláteis.

Neste sentido, nesta tese caracterizou-se primeiramente a casca externa de *Eucalyptus globulus* recolhida na região de Aveiro, em particular no que concerne à sua composição em ácidos triterpénicos e, determinou-se posteriormente a solubilidade destes compostos em diferentes soluções aquosas de líquidos iónicos de forma a permitir a escolha da melhor estrutura iónica a ser empregue na extração. A partir dos resultados anteriores, por fim, utilizaram-se soluções aquosas de líquidos iónicos para a extração de ácidos triterpénicos a partir da casca de *Eucalyptus globulus* visando a valorização económica destes resíduos.

1.2. Importância da biomassa vegetal como fonte de compostos bioativos

As plantas são fontes potenciais de compostos biologicamente ativos que podem desempenhar um papel importante na prevenção e tratamento de diversas doenças. Atualmente, mais de 50 mil espécies de plantas são utilizadas com fins nutracêuticos e medicinais e, mais de 25% dos medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) partem de estruturas químicas de compostos bioativos (6). Vários são os exemplos de medicamentos derivados de plantas, entre os quais se destacam analgésicos (morfina), anti-maláricos (artemisinina), anti-tumorais (vincristina e taxol), entre outros (7,8). Em muitos casos, o isolamento destes compostos a partir de recursos vegetais continua a ser a única opção viável devido à grande complexidade das suas estruturas (6). Alguns destes compostos bioativos são também encontrados em grande

abundância em subprodutos de indústrias agro-florestais como, por exemplo, as indústrias de pasta de papel (4). Neste contexto, o desenvolvimento de tecnologias eficientes para a extração destes compostos a partir de resíduos pode representar uma mais-valia inserida no conceito de biorrefinaria.

1.3. Conceito de Biorrefinaria

De acordo com o Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL), a “biorrefinaria é uma instalação industrial que integra processos e equipamentos destinados à conversão sustentável de biomassa em energia, combustíveis e produtos químicos” (9). Apesar do termo biorrefinaria ter ganho mais enfoque nos últimos anos, este conceito não é completamente novo. Atualmente, a novidade surge com o aproveitamento integral de biomassa para a produção de vários produtos finais associada a uma combinação de tecnologias e processos (químicos, bioquímicos e físicos) mais sustentáveis. Este processo integrado assenta numa abordagem semelhante à usada nas refinarias convencionais (Figura 1) (10–12).

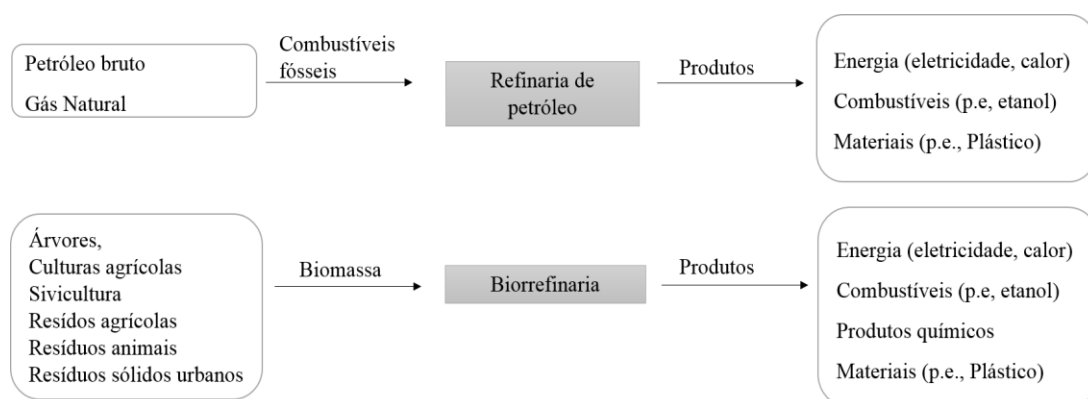


Figura 1: Conceito de biorrefinaria em comparação com a refinaria de petróleo [Imagem adaptada de (12)].

As instalações industriais de biorefinaria devem ser otimizadas com o objetivo de maximizar uma exploração integrada da biomassa, minimizando a produção de resíduos através do seu aproveitamento, visando a produção de novos produtos ou da sua conversão em bioenergia e biocombustíveis (9). O desenvolvimento de novos processos e produtos, bem como a valorização de subprodutos agroflorestais, são áreas com elevado potencial de inovação, especialmente quando estes resultam de processos industriais bem estabelecidos

fornecendo matéria-prima em abundância, sem acarretar custos adicionais, prontamente disponíveis e exploráveis sem afetar a linha de produção principal (11,13). Neste contexto, a indústria de pasta de papel em Portugal encontra-se, particularmente bem posicionada, nomeadamente no que se refere à exploração dos subprodutos da exploração do *E. globulus*, e em particular a casca.

1.4. O *Eucalyptus globulus* nas indústrias de pasta de papel

O género *Eucalyptus* é considerado uma das fontes de fibras mais importantes para as indústrias de pasta de papel na Península Ibérica, América do Sul (Brasil e Chile), África do Sul e Japão, entre outros países (1,2). Este género pertence à família Myrtaceae e compreende mais de 700 espécies, todas elas originárias da Austrália (ou, num número bastante reduzido, dos arquipélagos da Nova Guiné e das Ilhas Molucas), que posteriormente foram difundidas para os restantes países tropicais, subtropicais, mediterrâneos e temperados, dada a sua excepcional capacidade de adaptação às mais diversas condições ambientais. Apesar da grande diversidade de espécies, apenas algumas são amplamente utilizadas na produção de pasta de papel, entre as quais se destaca a espécie mais comum em Portugal, o *Eucalyptus globulus* (2). O crescente interesse por esta espécie está relacionado com o seu rápido crescimento e disponibilidade, bem como com características excepcionais da sua madeira para a produção de pasta de papel (3,14).

O *E. globulus* assume uma posição relevante na economia nacional (1,2) ocupando aproximadamente 26% da área do solo português (812 mil hectares) num território cuja área florestal representa cerca de 35,4% (Figura 2) (15).

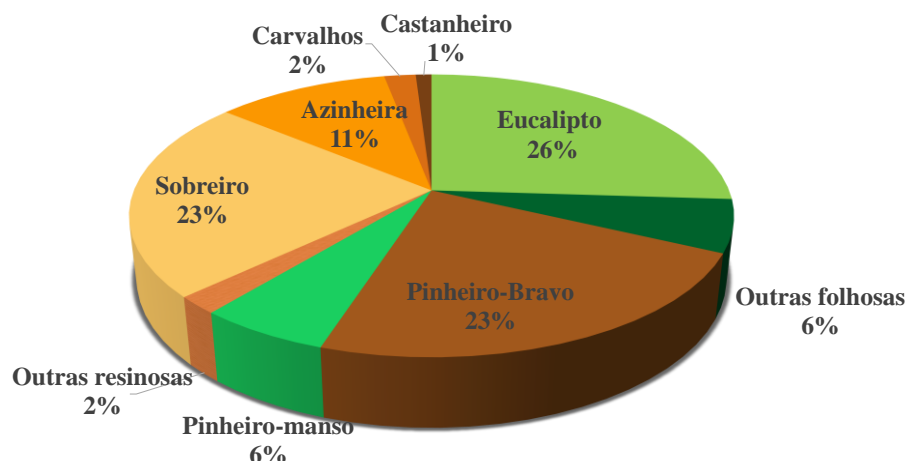


Figura 2: Distribuição da área total de Floresta por espécie dominante [Imagem adaptada de (15)].

A distribuição geográfica do eucalipto predomina ao longo de toda a faixa litoral do país com maior incidência na região Centro. Embora tenha sido introduzida no início do século XIX, a sua expansão é relativamente recente (meados do século XX) e coincide com o desenvolvimento da indústria de pasta de papel em Portugal (1,16). Esta espécie foi utilizada pela primeira vez em 1956 nas instalações fabris de Cacia, Aveiro, tendo-se demonstrado uma matéria-prima de excelência para a produção de pasta de papel (14).

1.4.1. Exploração de *E. globulus* nas indústrias de pasta de papel dentro do contexto biorrefinaria

As indústrias de pasta de papel geram quantidades significativas de sub-produtos (como folhas, ramos, frutos e, especialmente, a casca) que são atualmente incorporadas no solo como fontes de nutrientes ou então queimadas para a produção de energia (1,2). No entanto, em 2002, Freire *et al.* (4) demonstraram, pela primeira vez, que a casca externa de *E. globulus* é uma fonte valiosa de compostos de valor acrescentado, particularmente, em ácidos triterpénicos (4) que apresentam um vasto leque de propriedades biológicas (2). A extração destes compostos poderá constituir então uma abordagem alternativa para a valorização integrada destes sub-produtos (2), sem com isso afectar a sua valorização energética nem a principal linha de produção (17) – Figura 3.



Figura 3: Possível abordagem para a exploração dos ácidos triterpênicos da casca de *E. globulus* integrada numa indústria de produção de pasta de papel.

Desta forma, diversifica-se o tipo de produtos finais mas assegura-se que a principal linha de negócio deste sector não é afetada (17).

1.5. Compostos lipofílicos presentes na casca externa de *Eucalyptus globulus* e as suas propriedades.

1.5.1. Metabolismo primário e secundário das plantas

O metabolismo é um conjunto de reações bioquímicas que ocorrem continuamente na célula e pode ser dividido em metabolismo primário e secundário (18). O metabolismo primário das plantas desempenha funções vitais nas mais diversas atividades fisiológicas da célula, tais como a fotossíntese, respiração, reprodução e transporte de nutrientes (18). Os produtos envolvidos, como as proteínas, hidratos de carbono, ácidos nucleicos e lípidos, são responsáveis pela manutenção e sobrevivência das células comuns a todos os organismos sendo por isso de carácter conservativo (19). Além disso, alguns dos metabolitos primários apresentam-se como produtos de partida para as vias biossintéticas que dão origem aos produtos do metabolismo secundário (Figura 4) (20). Por sua vez, os metabolitos secundários são de natureza restrita a um determinado grupo taxonómico, ou exclusivos de uma determinada espécie, e compreendem uma grande variedade de compostos orgânicos que podem variar consoante o tecido e o estado de desenvolvimento da planta (19). Estas substâncias, apesar de não apresentarem uma função direta no crescimento e/ou desenvolvimento das plantas, desempenham um papel fundamental na resposta destas a fatores bióticos (organismos patogénicos e herbívoros e competição entre plantas), como também, contra o *stress* abiótico (deficiência de nutrientes e minerais do

solo, tolerância a temperaturas extremas, processos de adaptação, radiação ultravioleta e *stress* hídrico) (18).

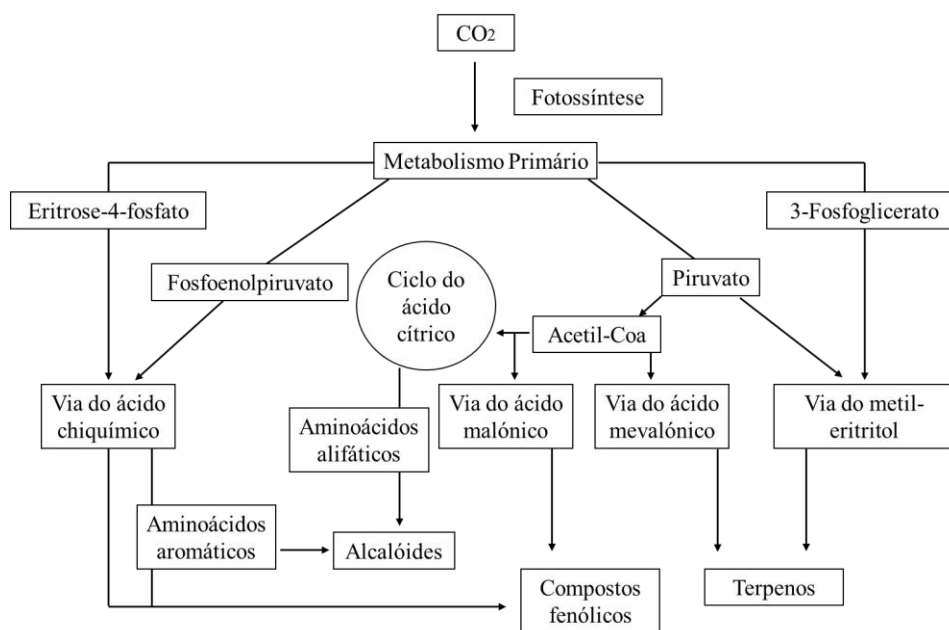


Figura 4: Vias principais do metabolismo secundário das plantas [Imagem adaptada de (18)].

Dada a importância econômica que o *E. globulus* assumiu nas últimas décadas, a sua composição química (e em particular a casca) tem vindo a ser estudada em detalhe, nomeadamente no que concerne às suas frações lipofílicas e fenólicas. Estas duas grandes famílias de metabolitos secundários representam a maior fração de produtos de valor acrescentado no eucalipto.

1.5.2. Extrátaveis lipofílicos da casca externa do *E. globulus*

Os extratos lipofílicos da casca de *E. globulus* são compostos, essencialmente, por ácidos gordos, álcoois alifáticos de cadeia longa, esteróis, terpenos e ácidos triterpénicos (2,3). Estes são, geralmente, extraídos com o uso de solventes orgânicos, tais como o diclorometano (4). Todavia, a quantidade de extrátaveis varia entre diferentes espécies ou, até, dentro da mesma espécie de *Eucalyptus* dependendo de factores como a idade, condições ambientais (localização geográfica, clima e tipo de solo) e todos os fatores que envolvem o *stress* biótico e abiótico (2,21).

Freire *et al.* (4) estudaram a fração lipofílica da casca de *E. globulus* e observaram que a casca externa apresenta um teor de extrativos cerca de nove vezes superior à da casca interna. Desde então, Freire *et al.* (4) e Domingues *et al.* (1,2) têm vindo a estudar maioritariamente a casca externa de eucalipto uma vez que esta é, particularmente, rica em ácidos triterpénicos (22,8 g/kg), com estruturas do tipo lupano (ácidos betulónico e betulínico), ursano (ácidos ursólico e 3-acetilursólico) e oleanano (ácidos oleanólico e 3-acetiloleanólico) - (Figura 5 Tabela 1).

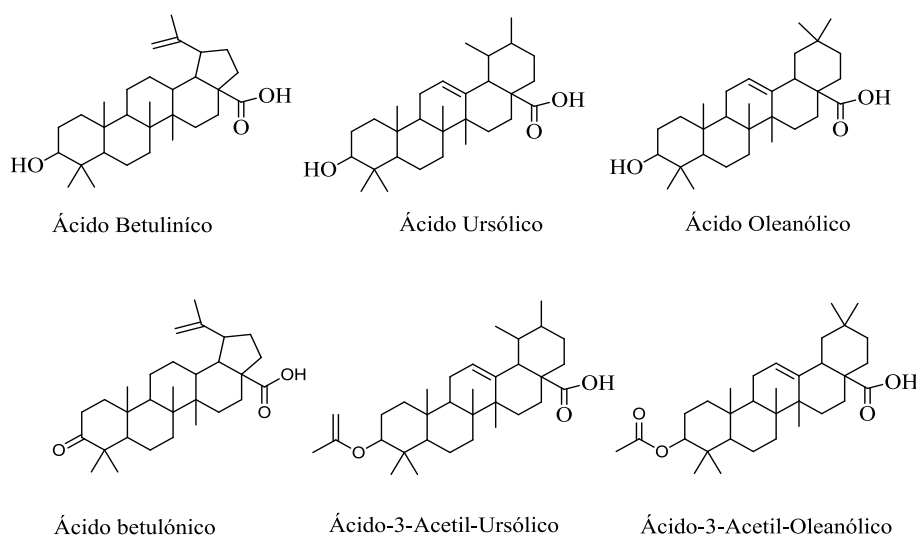


Figura 5: Estrutura dos ácidos triterpénicos identificados na casca externa de *E. globulus* [Imagem adaptada de (2,4)].

A Tabela 1 mostra as quantidades de ácidos triterpénicos determinadas por Freire *et al.* (4), sendo que as estruturas do tipo ursano (o ácido ursólico juntamente com a sua forma acetilada) são as mais abundantes, representando até 12,1 g/kg (1,2).

Tabela 1: Principais componentes triterpênicos identificados na casca externa da *E.globulus* (g /kg) (2).

<i>Componentes</i>	<i>E. globulus (g/kg)</i>
Ácidos triterpênicos maioritários	21,3
Ácido betulônico	2,6
*Ácido oleanólico (AO)	4,1
Ácido betulínico (AB)	2,6
*Ácido ursólico (AU)	12,1
Outros triterpenóides	1,5
Total de triterpenóides	22,8

* Incluindo os derivados acetilados

Com base no que foi reportado por Freire *et al.* (4), se uma fábrica de pasta de papel produzir em média 500 mil toneladas/ano de pasta, geram-se cerca de 100 mil toneladas/ano de casca. Este valor corresponde a um potencial anual de mais de 240 toneladas de ácido ursólico (AU), 80 toneladas de ácido oleanólico (AO), 53 toneladas de ácido betulínico (AB) e 50 toneladas de ácido betulônico (1,2,22). Desta forma, este resíduo gerado por uma fábrica de papel parece ser uma matéria-prima promissora para o desenvolvimento de um processo integrado visando a exploração de ácidos triterpênicos (13).

1.5.3. Terpenos e terpenóides e sua biossíntese

Os terpenos encontram-se em abundância em plantas superiores e são uma família de compostos orgânicos provenientes do metabolismo secundário das plantas, tendo sido identificados, até ao momento, cerca de 30000 compostos (7,23). Estruturalmente, os terpenos são constituídos por unidades de isopreno (C_5H_8), como representado na Figura 6 (19,24).

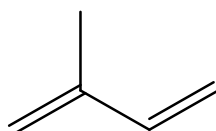


Figura 6: Estrutura do Isopreno.

A biossíntese de terpenos provém de duas vias distintas: a via do ácido mevalónico (MVA) que ocorre no citoplasma e a via da 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP), também conhecida por 2-C-Metil-D-Eritrol-4-fosfato (MEP), que tem lugar nos plastídios. Destas duas vias derivam os precursores universais de isopreno biologicamente ativos, o pirofosfato de isopentenilo (IPP) e o isómero pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) (Figura 7) responsáveis pela formação de uma grande variedade de compostos com formas cíclicas e acíclicas. Estas unidades ligam-se, na maioria das situações, segundo um mecanismo típico *'cabeça-com-cauda'* e, consoante o número de unidades incorporadas, é possível classificá-los como hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterpenos (C25), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) (24). Do ponto de vista químico, estes compostos são classificados como terpenos quando apresentam na sua estrutura apenas carbono e hidrogénio, e como terpenóides quando apresentam oxigénio na sua estrutura (22).

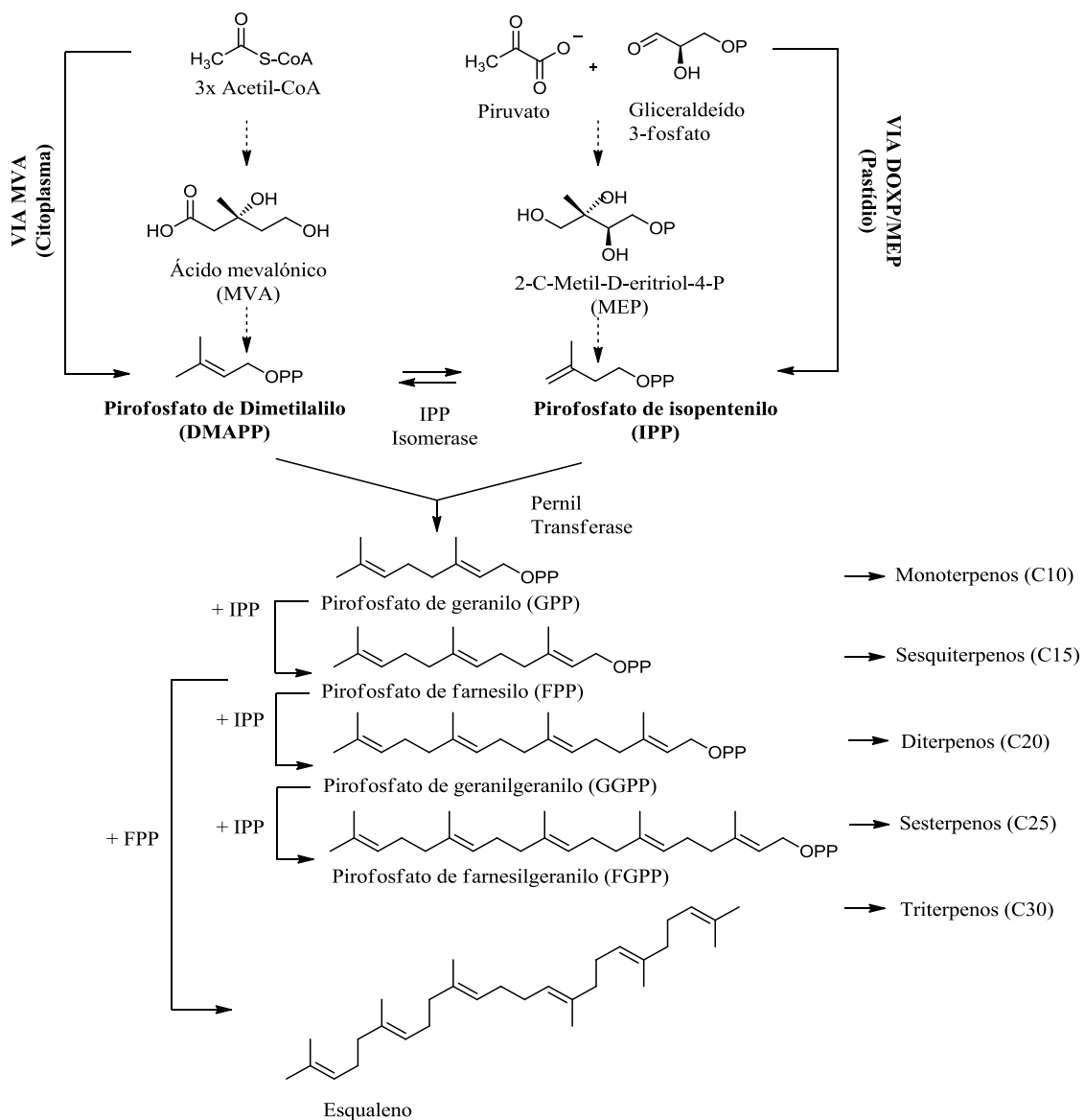


Figura 7: Duas vias possíveis para a síntese de IPP (isopentenil difosfato) e DMAPP (dimetilalil difosfato): Via Mevalonato (MVA) e via 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP) ou 2-C-Metil-D-Eritrol-4-fosfato (MEP) [adaptado de (7)].

Muitos terpenos, especialmente os terpenóides, têm-se mostrado úteis para o Homem na prevenção e terapia de várias doenças, nomeadamente contra o cancro, a malária e uma variedade de doenças infecciosas (virais, bacterianas e parasitárias), entre outras (7,24). Como resultado, alguns destes compostos encontram-se atualmente disponíveis e são comercializados pela indústria farmacêutica, como é o caso do Taxol (fármaco antitumoral) e a Artemisinina (fármaco antimalárico) (7).

1.5.3.1. Triterpenóides pentacíclicos

Os triterpenos são um grupo relevante de terpenos formados por seis unidades de isopreno, de forma molecular $C_{30}H_{48}$, e podem apresentar estruturas acíclicas ou mono-, bi-, tetra- e penta-cíclicas (23). Estes ocorrem amplamente na natureza e encontram-se em diversas partes morfológicas das plantas, tais como na casca, na folha, e no caule (22,25). Este grupo de metabolitos é constituído por duas unidades de pirofosfato de farnesilo (FPP), condensados segundo um mecanismo “*cauda-cauda*” (ao contrário do mecanismo típico “*cabeça-cauda*” dos terpenos mais simples). Esta reação é catalisada por meio da enzima esqualeno sintase com consequente formação do esqualeno, precursor dos triterpenos (Figura 8) (23).

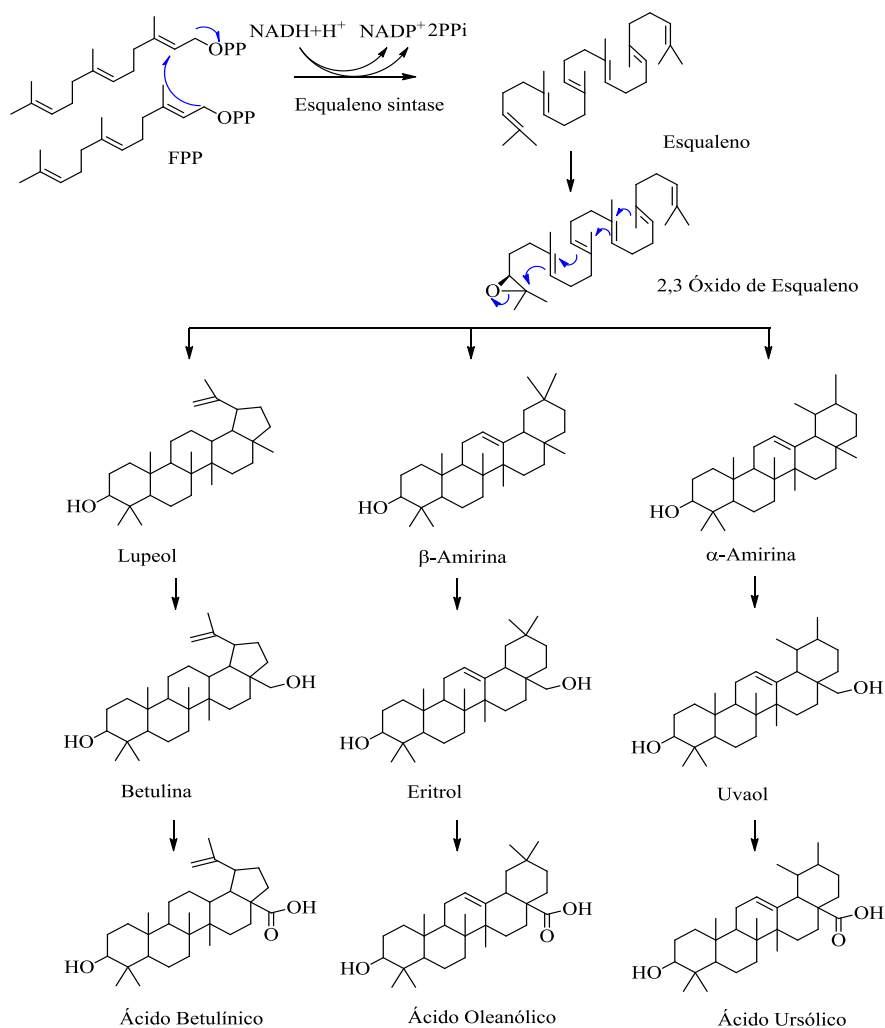


Figura 8: Biossíntese dos triterpenóides pentacíclicos.

A ciclização dos triterpenos advém de uma série de reações, as quais contemplam a epoxidação seletiva na posição 2, dando origem ao 2,3-óxido de esqualeno, que posteriormente é ciclizado formando vários conformémeros, e dependendo da sua conformação, dá-se a síntese de vários compostos, nomeadamente dos triterpenóides pentacíclicos (22). Os triterpenóides pentacíclicos podem ser divididos em três grupos principais: os derivados da β -amirina, da α -amirina e do lupeol (23), como representado na Figura 8. Entre estes, o ácido betulínico, o ácido oleanólico, o ácido ursólico e os seus derivados acetilados são os que têm atraído maior interesse por apresentarem uma variedade de atividades biológicas (anti-inflamatórios, anti-bacterianos, anti-virais, anti-tumorais, entre outros) (22,23,25,26).

1.5.4. Triterpenos e atividade biológica

Existe um grande número de trabalhos publicados sobre as propriedades biológicas dos triterpenos pentacíclicos, particularmente, daqueles com estruturas do tipo lupano, ursano e oleanano (22,25–28). Por exemplo, o ácido ursólico e o seu isómero, ácido oleanólico, possuem atividades biológicas em comum, entre as quais hepato-protetora (26,28,29), anti-tumoral (22,26,28), antimicrobiana (26,30), anti-inflamatória (28,29) e propriedades antioxidantes (25). Estes compostos são ainda conhecidos por apresentarem toxicidade muito baixa (22,28). Por sua vez, o ácido betulínico, além de exibir atividade anti-inflamatória (25,26,31), antioxidante (25) e anti-tumoral (22,26,28), também é conhecido pelas suas propriedades anti-HIV (26,31), anti-bacteriana (26) e anti-malária (32).

De um modo geral, as propriedades anti-inflamatórias atribuídas aos triterpenos devem-se à sua elevada capacidade de suprimirem a expressão de certas enzimas, nomeadamente a INOS (Óxido nítrico síntase induzida), MMP-9 (metaloproteínase-9) (26,33), COX-2 (ciclo-oxigenase-2), citosinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão, via inibição do NF- κ B. Por outro lado, os triterpenos estimulam enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), permitindo deste modo neutralizar as espécies reativas de oxigénio (EROS) e assim prevenir e/ou retardar determinadas patologias (25).

Estas atividades biológicas, juntamente com o carácter anti-proliferativo, anti-metastático e anti-angiogénico têm sido estudadas conjuntamente com as suas propriedades anti-tumorais (25,34). Os efeitos anti-tumorais devem-se à capacidade seletiva dos triterpenos de induzirem as vias apoptóticas celulares (intrínseca e extrínseca) através da permeabilização mitocondrial e da produção de espécies reativas de oxigénio (EROS). Em contrapartida, as células normais mostraram ser resistentes, o que aponta para uma abordagem terapêutica específica para tratamentos de tumores (22,27,31). No entanto, entre eles, o AB tem sido o mais estudado (22,27,31) e encontra-se, atualmente, em fase II nos ensaios clínicos para o tratamento ou prevenção do melanoma (35).

Em particular, o ácido ursólico mostrou efeitos benéficos contra a redução da massa muscular esquelética relacionada com a idade e a atrofia muscular (36). Ebert *et al.* (36) referiram a capacidade deste triterpeno em inibir um sub-conjunto de mRNAs no músculo envelhecido que são regulados positivamente pelo fator de transcrição ATF-4 (proteína que atua na fraqueza muscular como na atrofia impedindo/reduzindo a síntese de proteínas que os músculos necessitam para permanecerem fortes). A descoberta deste mediador-chave, ATF-4, fornece uma base importante para pesquisas futuras neste domínio (36). Para além disso, o ácido ursólico é atualmente usado como suplemento alimentar (37). Por outro lado, o ácido oleanólico evidenciou um papel hepatoprotetor em lesões hepáticas agudas induzidas quimicamente, assim como na fibrose e cirrose causada por doenças crónicas (29). Os seus efeitos protetores foram demonstrados pela capacidade combinada anti-inflamatória e antioxidante como também na modulação dos sistemas enzimáticos que metabolizam drogas (28). Por exemplo, a presença de muitos compostos hepatotóxicos (como o álcool) requerem ativação metabólica dos sistemas hepáticos que podem induzir a geração de EROS. Quando a capacidade de produção de EROS é superior aos mecanismos de defesa antioxidante da célula ocorre *stress* oxidativo que pode danificar várias macromoléculas biológicas (proteínas, lípidos e ADN) (38). O ácido oleanólico é capaz de ativar o fator nuclear eritróide, Nrf2, fator de transcrição de genes codificantes de proteínas antioxidantes que desempenham um papel fundamental na citoproteção contra a lesão oxidativa (29,38). De fato, este triterpeno é atualmente usado na China como um medicamento oral para tratamento de doenças hepáticas, incluindo hepatite aguda e crónica bem como outras desordens hepáticas (22,28,29).

De um modo geral, os ácidos triterpênicos são utilizados como suplementos alimentares e como agentes terapêuticos, sendo que alguns deles já se encontram na fase II de ensaios clínicos (22,27). Assim, a extração de ácidos triterpênicos a partir da casca de *E. globulus* (resíduo proveniente da indústria da papel) pode representar uma contribuição importante para a valorização desta espécie (1,2,22) considerando os efeitos biológicos benéficos e o elevado valor comercial dos mesmos (AU = 9660 €/kg, AO = 7050 €/kg, AB = 5100 €/kg) (39).

1.6. Métodos de extração de ácidos triterpênicos a partir da casca de eucalipto

O isolamento de ácidos triterpênicos a partir de resíduos de biomassa é, geralmente, conseguido por extrações do tipo sólido-líquido utilizando solventes orgânicos de polaridade adequada. A abordagem mais comum e simples para obter estes compostos a partir da casca de eucalipto, no entanto ainda a nível laboratorial, tem sido a extração em sohxlet com diclorometano (1,3,22). Contudo, a sua utilização a larga escala é vista como desvantajosa uma vez que se trata de um método moroso, trabalhoso e que requer um elevado consumo energético e de solventes orgânicos voláteis tóxicos (40,41). A fim de superar este problema, Domingues *et al.* (5) estudaram a extração de ácidos triterpênicos com dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂). De salientar que apesar de ser um método vantajoso do ponto de vista ambiental, apenas se consegue recuperar cerca de 80% dos ácidos triterpênicos a partir da casca de *E.globulus*, quando comparado com a extração em sohxlet (5,22,42,43). Por outro lado, a sua utilização exige equipamento e condições operacionais dispendiosas e, devido à sua reduzida polaridade, não descarta totalmente o uso de co-solventes orgânicos, nomeadamente o etanol como forma de maximizar o rendimento de extração (40).

De modo a ultrapassar as limitações e desvantagens dos solventes orgânicos e na perspectiva de obter melhores eficiências de extração do que as obtidas com o SC-CO₂, as soluções aquosas de líquidos iónicos surgem como solventes alternativos (40).

1.7. Líquidos Iónicos

Os líquidos iónicos (LIs) são sais orgânicos com um ponto de fusão inferior a 100°C, sendo que um número considerável se encontra no estado líquido à temperatura ambiente. Os seus baixos pontos de fusão, comparativamente com sais comuns, deve-se às suas fracas ligações electroestáticas e baixa simetria, o que dificulta o seu empacotamento e

inibe a formação de uma rede cristalina (40,44,45). Estes sais são constituídos pela combinação de cátions orgânicos, geralmente bastantes volumosos e assimétricos, e aniões que podem ser orgânicos ou inorgânicos, tipicamente mais pequenos (46,47). Apesar de existir uma grande variedade de LIs, os mais utilizados são baseados num número restrito de famílias de cátions, como o imidazólio, pirrolidínio, piridínio, piperidínio e amónios quaternários, combinados com uma enorme variedade de aniões, desde o cloreto, brometo, hexafluorofosfato e tetrafluoroborato, entre outros (40,48). Algumas destas estruturas iónicas estão representadas na Figura 9.

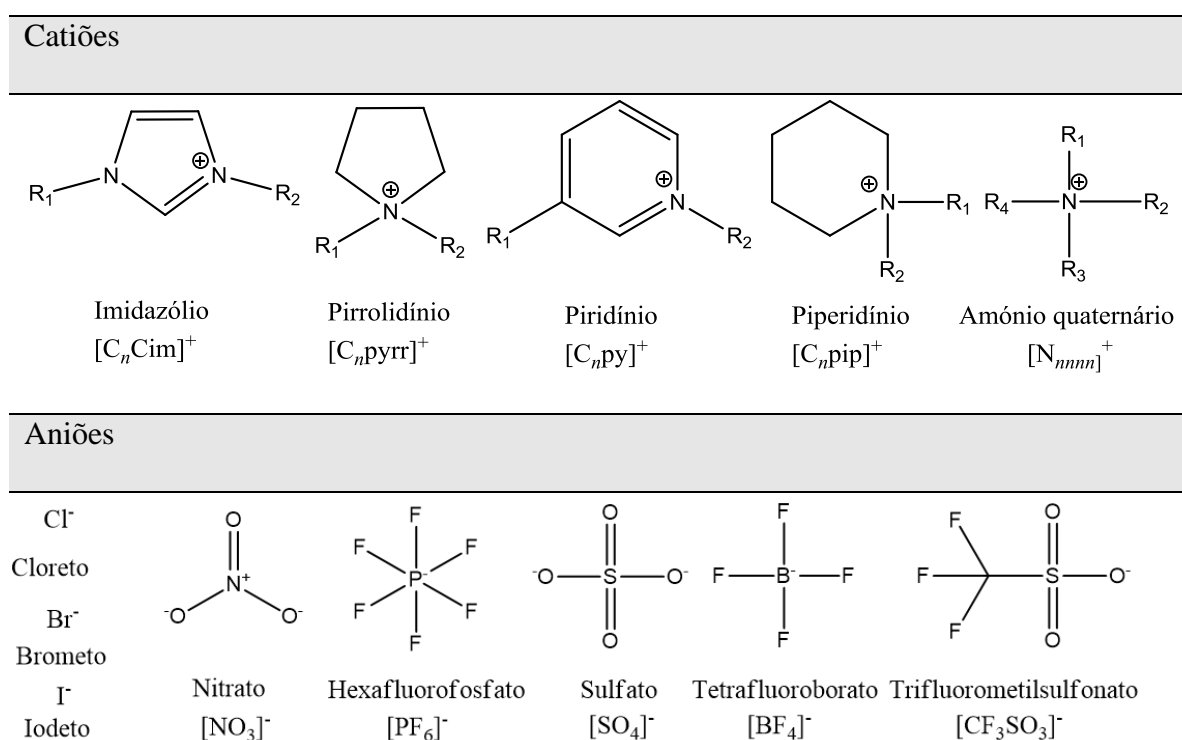


Figura 9: Estruturas químicas de alguns cátions e aniões de líquidos iónicos.

Ao contrário dos solventes tradicionais, os líquidos iónicos apresentam uma série de propriedades físico-químicas únicas, como uma reduzida pressão de vapor, elevada condutividade iónica, elevada estabilidade química e térmica, são não-inflamáveis e apresentam elevada capacidade de solvatação para os mais diversos compostos (orgânicos, inorgânicos e organometálicos) (46,48,49). No entanto, estas propriedades podem ser moduladas através da combinação de diferentes aniões e cátions e, assim, regular determinada propriedade de acordo com o objetivo da aplicação (40,48). Esta capacidade ajustável, através da seleção específica dos seus iões, contribuiu para a sua classificação

como *'designer solvents'*. Para além disso, propriedades como a baixa volatilidade e o fato de serem não-inflamáveis permitiram o seu reconhecimento como *"green solvents"*) e, portanto, uma alternativa ideal à utilização dos solventes orgânicos voláteis e tóxicos (48,49). Adicionalmente, devido à possibilidade de serem reciclados, por serem não-voláteis, torna-os ainda mais sustentáveis minimizando o impacto ambiental (40,49). Todas estas características fazem dos líquidos iônicos solventes extremamente atrativos numa diversidade de aplicações, nomeadamente na área de síntese orgânica, catálise/biocatálise, eletroquímica, química analítica e em técnicas de extração e separação (44,49).

Apesar de todos os benefícios ambientais que os LIs possam apresentar, estes não são completamente desprovidos de toxicidade (44,47,50). Embora eles possam diminuir o risco de poluição atmosférica devido à sua baixa pressão de vapor, alguns podem ter uma solubilidade significativa em água podendo representar uma potencial ameaça para os organismos aquáticos (44,50). Segundo alguns estudos, a toxicidade dos LIs é determinada primordialmente pela natureza do catião e está diretamente correlacionada com o comprimento da cadeia alquílica lateral (44,50). No entanto, a procura de aniões e catiões mais biodegradáveis, biocompatíveis, menos tóxicos e menos dispendiosos tem recebido um especial destaque nos últimos anos (40). Alguns exemplos incluem LIs obtidos, por exemplo, a partir de ácidos carboxílicos (ex. ácido láctico), aminoácidos, colina, etc (40).

1.8. Líquidos iônicos como solventes alternativos para a extração de compostos naturais

Um dos principais desafios para uma exploração eficiente de compostos naturais incide na substituição dos sistemas de extração e purificação atualmente conhecidos por processos mais sustentáveis. A utilização de LIs como solventes de extração não é novidade. Na verdade, nos últimos anos, demonstrou-se que os LIs são solventes alternativos e que permite uma extração eficiente de uma variedade de metabolitos secundários, tais como alcalóides, flavonóides, terpenóides, entre outros, a partir de fontes vegetais (40,49). No entanto, até ao momento, apenas foi reportado um estudo sobre a utilização de LIs puros para a extração de um ácido triterpénico - betulina - a partir da bétula (51). De um modo geral, os LIs conduziram a elevados rendimentos de extração quando comparados com solventes convencionais (51,52).

Tal como acontece com solventes convencionais, os processos de extração a partir de biomassa envolvendo LIs são do tipo sólido-líquido, e dependem de uma grande variedade

de factores tais como: a concentração de LI, pH, tempo e temperatura de extracção, razão sólido-líquido, tamanho de partícula, entre outros (49). No entanto, a verdadeira força motriz para um processo eficiente está relacionada com a seleção adequada da estrutura do LI (tipo de anião e catião) (40,49). Tal como mencionado por Cláudio *et al.* (53), que investigaram a extração da cafeína a partir de sementes de guaraná utilizando soluções aquosas de LIs, os mecanismos e eficiências de extração são regidos pela estrutura do LI e sua influência sobre a estrutura morfológica da biomassa. Os mesmos autores (53) enfatizaram a capacidade melhorada das soluções aquosas de LIs, face a LIs puros, na extração de compostos de valor acrescentado a partir da biomassa. No mesmo sentido, Passos *et al.* (40) reportaram que as soluções aquosas de LIs são mais vantajosas, não só por serem menos viscosas, mas pelo fato de se utilizar água como solvente primordial o que reduz o impacto ambiental e o custo associado. Para além destas vantagens, alguns autores mostraram a capacidade de LIs atuarem como surfactantes (54,55) ou hidrótropos (56) quando em solução aquosa, o que permite aumentar significativamente a solubilidade de compostos pouco solúveis em água e por sua vez aumentar o rendimento de extração (56).

Apesar de serem solventes mais dispendiosos, os LIs permitem aumentar consideravelmente a eficiência de extração contribuindo assim para reduzir consideravelmente o custo associado ao processo (40,49). Segundo Passos *et al.* (40) ‘*os LIs apresentam inúmeras vantagens e não devem ser descartados com base apenas no seu preço*’. A decisão de se utilizar LIs como solventes alternativos deve ter em conta a eficiência do processo, o custo do LI, a possibilidade de o reutilizar e reciclar, e o valor comercial dos produtos de valor acrescentado a extrair.

Face ao exposto, nesta tese é proposta, pela primeira vez, a utilização de soluções aquosas de LIs como alternativa aos solventes orgânicos voláteis para a extração seletiva de ácidos triterpénicos a partir da casca de eucalipto.

2. Procedimento experimental

2.1. Amostras e reagentes

2.1.1. Colheita da casca externa de *E. globulus*

A casca externa de eucalipto foi recolhida na zona da Gafanha da Nazaré, Aveiro, em Janeiro e em Outubro de 2015. As amostras foram mergulhadas em azoto líquido e seguidamente trituradas num moinho Dietz-motoren GmbH & Co. KG. As amostras com um diâmetro entre $0.4 \text{ mm} < d < 1.0 \text{ mm}$ foram armazenadas à temperatura ambiente e utilizadas.

2.1.2. Reagentes

Os líquidos iónicos seleccionados neste trabalho, e a estudar como solventes alternativos, foram o acetato de 1-etil-3-metilimidazólio, $[\text{C}_2\text{C}_1\text{im}][\text{CH}_3\text{CO}_2]$; dicianamida de 1-butil-3-metilimidazólio, $[\text{C}_4\text{C}_1\text{im}][\text{N}(\text{CN})_2]$; etilsulfato de 1-butil-3-metilimidazólio, $[\text{C}_4\text{C}_1\text{im}][\text{C}_2\text{H}_5\text{SO}_4]$; tiocianato de 1-butil-3-metilimidazólio, $[\text{C}_4\text{C}_1\text{im}][\text{SCN}]$; tosilato de 1-butil-3-metilimidazólio, $[\text{C}_4\text{C}_1\text{im}][\text{TOS}]$; cloreto de 1-butil-1-metilpirrolidínio, $[\text{C}_4\text{C}_1\text{pyrr}]\text{Cl}$; dicianamida de 1-butil-3-metilpiridínio, $[\text{C}_4\text{C}_1\text{py}][\text{N}(\text{CN})_2]$; cloreto de 1-metil-3-octilimidazólio, $[\text{C}_8\text{C}_1\text{im}]\text{Cl}$, cloreto de 1-decil-3-metilimidazólio, $[\text{C}_{10}\text{C}_1\text{im}]\text{Cl}$; cloreto de 1-dodecil-3-metilimidazólio, $[\text{C}_{12}\text{C}_1\text{im}]\text{Cl}$; cloreto de 1-metil-3-tetradecilimidazólio, $[\text{C}_{14}\text{C}_1\text{im}]\text{Cl}$; cloreto de 1-hexadecil-3-metilimidazólio, $[\text{C}_{16}\text{C}_1\text{im}]\text{Cl}$; cloreto de 1-metil-3-octadecilimidazólio, $[\text{C}_{18}\text{C}_1\text{im}]\text{Cl}$; octilsulfato de 1-butil-3-metilimidazólio, $[\text{C}_4\text{C}_1\text{im}][\text{C}_8\text{H}_{17}\text{SO}_4]$; e cloreto de tributiltetradecilfosfónio, $[\text{P}_{444,14}]\text{Cl}$. Todos os LIs derivados de imidazólios foram adquiridos comercialmente à Iolitec e o $[\text{P}_{444,14}]\text{Cl}$ for fornecido pela Cytec Industries Inc.. Todos os LIs apresentam um grau de pureza superior a 98 wt% de acordo com a informação dada pelos fornecedores. Para além dos LIs, também se estudaram surfactantes convencionais, nomeadamente o dodecilsulfato de sódio (SDS) da Alfa Aesar, dodecilfenilsulfato de sódio (SDBS) da Sigma Aldrich e o brometo de hexadeciltrimetilamónio (CTAB) proveniente da Fluka. Todos os surfactantes convencionais apresentam um grau de pureza superior a 99 wt%. As estruturas químicas dos catiões e aniões que compõem a lista de ILs e os surfactantes investigados neste trabalho estão representados na Figura 10. O ácido ursólico, betulínico e oleanólico foram fornecidos pelo Sigma, todos com pureza superior a 98 %.

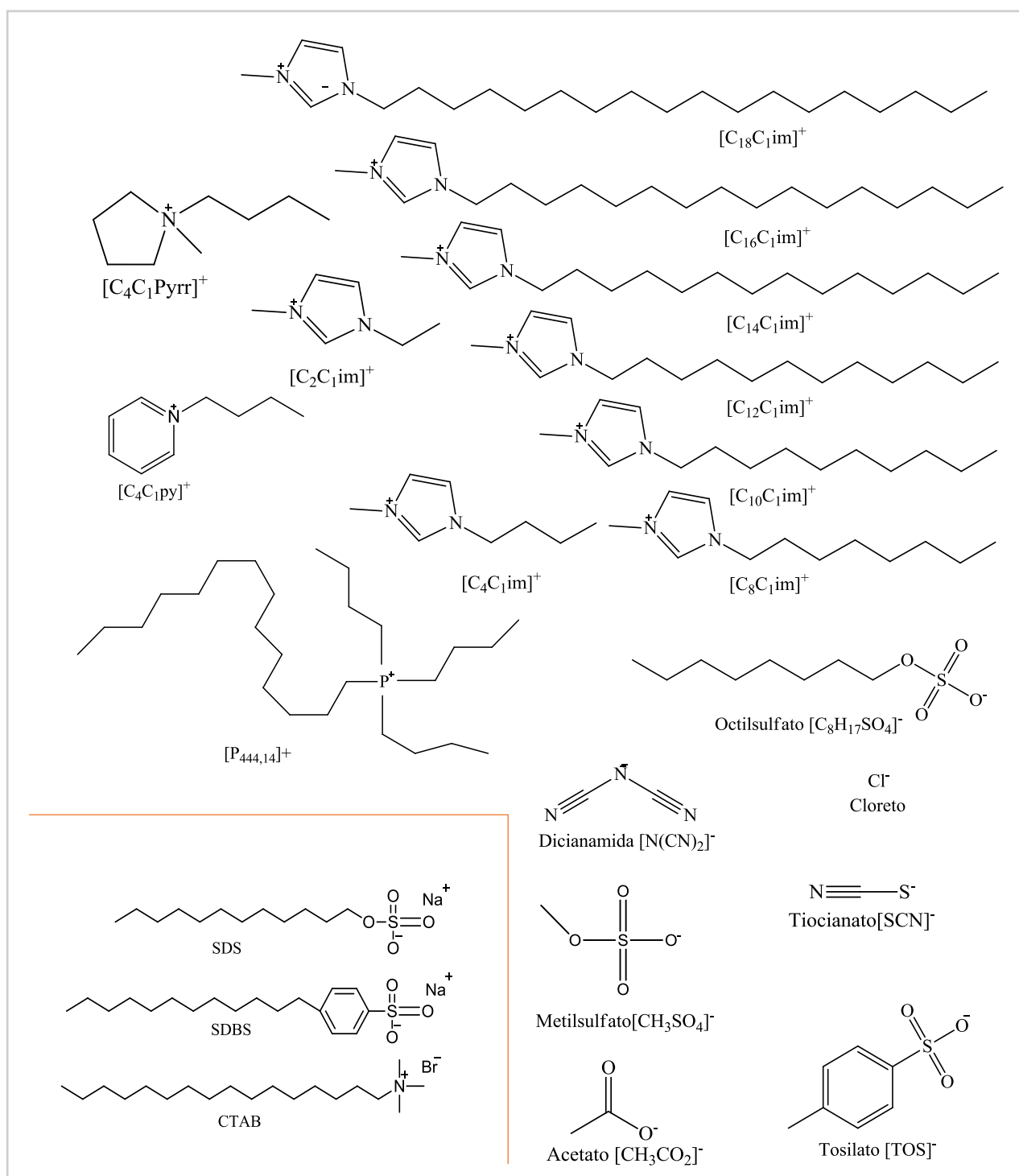


Figura 10: Estrutura química dos cátions e ânions que compõem os líquidos iônicos [A] e dos surfactantes convencionais [B] usados neste trabalho.

2.2. Caracterização da casca externa de *Eucalyptus globulus*

2.2.1. Teor de humidade

Foram pesadas e colocadas na estufa a uma temperatura de 105 °C durante 72 h (até a massa final se manter constante) cerca de 2 gramas de casca externa de eucalipto de modo a determinar o teor de humidade das amostras. Esta determinação foi realizada em duplicado.

2.2.2. Caracterização da casca externa de *E. globulus* por GC-MS

Para a identificação e quantificação dos compostos lipofílicos presentes na casca externa de *E. globulus* (3 g) foi realizada uma extração (em duplicado) em soxhlet com diclorometano durante 6 h de uma amostra. O solvente foi removido recorrendo a um evaporador rotativo, e o extrato foi pesado e quantificado em percentagem por peso seco de biomassa. O diclorometano foi selecionado por ser um solvente com afinidade para compostos lipofílicos (1–3). Posteriormente e, visando a caracterização do extrato por GC-MS, duas alíquotas de cada extrato seco foram submetidas a um processo de derivatização. Cerca de 15 mg de extrato foi dissolvido em 250 µL de piridina com padrão interno (tetracosano) numa concentração de 2,42 mg/mL e foi trimetilsililado pela adição de 250 µL de *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) e 50 µL de trimetilclorossilano (TMSCl), como catalisador. A mistura reacional foi colocada em banho de óleo a 70 °C durante 30 m. A análise por GC-MS foi realizada com recurso a um “Trace gas chromatograph” equipado com um espectrómetro de massa “Thermo Scientific DSQ II”. A separação dos compostos foi realizada numa coluna capilar DB-1 J&W (30 m x 0.32 mm de diâmetro interno e 0.25 µm de espessura de filme), utilizando hélio como gás de arraste (35 cm/s). As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura inicial 80°C durante 5 min; aumento de 4°C/min até aos 260 °C, seguido de um aumento de 2°C/min até aos 285°C, temperatura que foi mantida durante 20 min; temperatura do injetor 250°C; temperatura de “transfer-line” 290°C; razão de separação 1:50. O espectrómetro de massa foi usado no modo de impacto eletrónico a uma energia de 70 eV e os dados obtidos foram recolhidos a uma taxa de 1 scan/s, na gama de *m/z* 33-700. A fonte de ionização foi mantida a 250°C.

Os compostos foram identificados como derivados de TMS por comparação dos seus espectros de massa e tempos de retenção característicos com dados da literatura (4,22). As

amostras foram injetadas em triplicado. As condições aqui descritas foram adaptadas a partir da literatura (1–3).

2.3. Quantificação de ácidos triterpênicos por HPLC-UV

2.3.1. Condições cromatográficas

A quantificação dos ácidos triterpênicos, quer nos ensaios de solubilidade quer na extração, foi realizada com um HPLC Gilson equipado com termostato de coluna de fase reversa Kinetex C18 100A (dimensões da coluna: 250x4.6mm; tamanho do poro: 174) acoplado a um forno e com injetor manual. A aquisição dos dados e avaliação foram realizados utilizando o software Jasco-Borwin 1.21. A fase móvel é constituída por um gradiente de 13 % de solução aquosa de TFA (ácido trifluoracético) e 87% de metanol, com um fluxo de 1 mL/min em ambiente isocrático. Antes da utilização, a fase móvel foi desgaseificada recorrendo a ultra-sons. A temperatura da coluna foi mantida a 30°C, e o detetor fixado a um comprimento de onda de 210 nm. O tempo de corrida de cada amostra teve duração de 12 min. Todas as soluções padrão e amostras foram filtradas através de um filtro 0,20 µm antes de cada injeção. De salientar que se utilizou previamente um espectrofotómetro UV-Vis, Shimadzu UV-1800, para inferir sobre o comprimento de onda de absorção máxima do ácido ursólico no intervalo de 190-400 nm.

2.3.2. Curvas de calibração dos ácidos ursólico, oleanólico e betulínico

As soluções padrão dos ácidos ursólico, oleanólico e betulínico foram preparadas por diluição de uma solução mãe em metanol a 1 mg/mL conforme representado na Tabela 2. Cada solução-padrão foi injetada em triplicado para gerar a curva de calibração pretendida.

Tabela 2: Preparação das soluções padrões.

Solução	Diluições	[AU]/[mg/mL]
A	5,0 mg em 5,0 mL	1,000
B	1,0 mL A em 2,0 mL	0,500
C	1,0 mL A em 5,0 mL	0,200
D	0,5 mL A em 5,0 mL	0,100
E	0,5 mL B em 5,0 mL	0,050
F	0,5 mL C em 5,0 mL	0,020
G	0,5 mL D em 5,0 mL	0,010
H	0,5 mL E em 5,0 mL	0,005

De modo a validar as curvas de calibração estabelecidas e o efeito do LI sobre a quantificação, prepararam-se soluções de ácido ursólico em triplicado com concentrações conhecidas (0,056; 0,5; 1,0 e 1,5 mg/mL) em soluções aquosas de [C₁₄C₁im]Cl a 500 mM. Após os cálculos efetuados com a recta de calibração, verificou-se que o método de quantificação era reprodutível sendo possível quantificar estas amostras com um erro máximo de 3%.

O limite de deteção (LD) do método analítico foi determinado através da equação $LD = 3 \times Sbr/b$ onde LD é expresso em concentração, B é o declive da reta de calibração e *Sbr* é uma estimativa da dispersão do branco determinado pelo desvio padrão da ordenada na origem. O limite de quantificação (LQ) foi avaliado de acordo com a equação $LQ = 10 \times Sbr/b$.

A precisão e exatidão do método analítico foram avaliadas através da repetibilidade das amostras de concentrações conhecidas de ácido ursólico em soluções aquosas de [C₁₄C₁im]Cl a 500 mM. As amostras foram injetadas 3 vezes consecutivas e quantificadas por HPLC-UV. A precisão é expressa pelo desvio padrão relativo (RSD (%)) e a exatidão pelo erro relativo (ER (%)).

2.4. Solubilidade do ácido ursólico em soluções aquosas de LIs e surfactantes convencionais

Para o estudo da solubilidade do ácido ursólico foram preparadas soluções aquosas de LIs e surfactantes convencionais a 50, 150, 250, 500, 750 e 1000 mM. Depois de homogeneizadas, foram transferidas para diferentes eppendorfs 1250 µl de cada solução e,

de seguida, adicionada uma quantidade em excesso de ácido ursólico puro (até a solução ficar saturada pela visualização de duas fases, sólido-líquido). Os eppendorfs foram colocados num Thermomixer Comfort, com uma velocidade de agitação de 750 rpm a 30°C durante 72 horas. Foram preparadas amostras em triplicado. Por fim, as amostras foram cuidadosamente filtradas com o auxílio de uma seringa e de um filtro de 0,20 µm e, posteriormente, quantificadas por HPLC utilizando as condições referidas anteriormente. Cada amostra foi injetada pelo menos 3 vezes. Este procedimento foi adaptado a partir da literatura (56).

O pH das soluções aquosas de líquidos iónicos ($[C_8C_{1im}]Cl$, $[C_{10}C_{1im}]Cl$, $[C_{12}C_{1im}]Cl$, $[C_{14}C_{1im}]Cl$, $[C_{16}C_{1im}]Cl$, $[C_{18}C_{1im}]Cl$, $[C_4C_{1im}][C_8H_{17}SO_4]$ e $[P_{444,14}]Cl$) foi, também, determinado usando um medidor de pH (Digimed, modelo DM21), previamente calibrado com soluções tampão pH 7,0 e pH 4,0 (QM Reagentes), à temperatura ambiente. O pH de todas as soluções de LIs foram medidos a uma concentração de 500 mM, excepto para o $[C_{18}C_{1im}]Cl$ que foi medido a 150 mM.

Após a saturação das soluções aquosas de LIs com ácido ursólico, e visando a recuperação do mesmo tendo por base o perfil de solubilidade *versus* concentração de LI obtido, preparou-se uma solução aquosa de $[C_4C_{1im}][C_8H_{17}SO_4]$ a 250 mM com uma concentração conhecida de 2,5 mg/mL de ácido ursólico à temperatura ambiente. Após a homogeneização adicionou-se água até se observar a formação de um precipitado. De seguida, procedeu-se ao isolamento do ácido ursólico precipitado por filtração a vácuo com um funil de placa porosa, lavando o precipitado sucessivas vezes com água fria, e depois secando-o na estufa a 30 °C.

2.4.1. CMC dos LIs estudados

A concentração micelar crítica (CMC) dos LIs estudados ($[C_{10}C_{1im}]Cl$, $[C_{12}C_{1im}]Cl$, $[C_{14}C_{1im}]Cl$, $[C_{16}C_{1im}]Cl$, $[C_{18}C_{1im}]Cl$, $[C_4C_{1im}][C_8H_{17}SO_4]$ e $[P_{444,14}]Cl$) foi determinada por condutividade em função da concentração utilizando um condutímetro, modelo Russel RL105, a 25 °C. Adicionaram-se, sucessivamente 400 µL da solução aquosa de LI a (250; 80; 20; 5,0; 2,5; 250 e 1200 mM, respetivamente) a 10 mL de água Mili-Q, a solução foi agitada para assegurar uma mistura homogénea e, determinou-se a condutividade após cada adição. A condutividade foi registada quando se observaram variações inferiores a 1% durante 2 minutos, procedimento adaptado a partir da bibliografia (57).

2.5. Extração dos ácidos triterpênicos da casca de eucalipto

O processo de extração dos ácidos triterpênicos a partir da casca de eucalipto foi realizado com: i) uma solução aquosa de $[C_{14}C_{1im}]Cl$ a 750 mM, ii) metanol e iii) com uma extração sequencial de $[C_{14}C_{1im}]Cl$ seguida de metanol. A Figura 11 mostra a placa utilizada para o efeito que permite temperatura e agitação controladas. As condições operacionais para a extração foram as seguintes: razão sólido/líquido ($R_{S/L}$) de 1:10, e tempo de extração de 1 e 4 h sob agitação a 750 rpm. Para as soluções aquosas de $[C_{14}C_{1im}]Cl$ a 750 mM a temperatura utilizada foi de 70 °C, e para o metanol foi de 40 °C. Por fim, as amostras foram centrifugadas e filtradas com o auxílio de uma seringa e de um filtro de 0,20 μm e, posteriormente, os ácidos triterpênicos foram quantificados por HPLC-UV.



Figura 11: Placa de aquecimento/agitação utilizada nas extrações.

2.6. Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)

As amostras de casca externa do eucalipto após a extração com i) metanol, ii) solução aquosa de $[C_{14}C_{1im}]Cl$, e iii) $[C_{14}C_{1im}]Cl$ e metanol foram lavadas com água várias vezes e secas à temperatura ambiente. Depois de secas, estas amostras foram analisadas por SEM usando um microscópio Hitachi SU-70 a 15 kV, após a deposição de uma camada de carbono. Além disso, uma amostra sem ter sido submetida à extração foi também analisada nas mesmas condições para ser usada como branco.

3. Resultados e Discussão

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização da casca externa de *E. globulus*

Antes de iniciar o estudo dos novos processos de extração com soluções aquosas de LIs, o primeiro passo consistiu na determinação do teor de humidade e de extratáveis presentes nas amostras de casca externa de *E. globulus* (Tabela 3). Para tal, efectuaram-se duas extrações, simultaneamente, em soxhlet com diclorometano (Figura 12). De seguida determinou-se o rendimento de extração (Tabela 3), e procedeu-se à identificação e caracterização dos ácidos triterpénicos presentes nos extractos por GC-MS (Tabela 4).

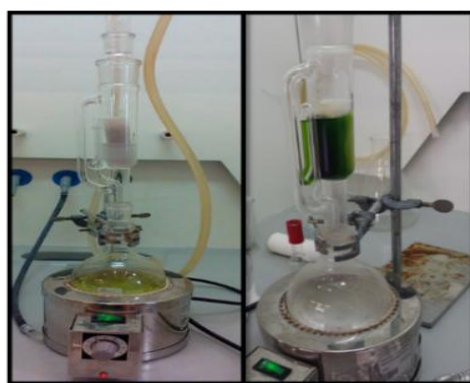


Figura 12: Extração em *soxhlet* com CH_2Cl_2 da casca externa de *E. globulus*.

Tabela 3: Teor de humidade e rendimentos de extração obtidos da casca externa de *E. globulus*. Os valores apresentam um desvio padrão associado resultante da análise de pelo menos duas réplicas.

<i>Espécie</i>	<i>Amostras</i>	<i>% Humidade</i>	<i>Rendimento de extração (%)</i>	<i>Colheita</i>
Eucalipto	Casca externa 1	$9,24 \pm 0,33$	$3,29 \pm 0,29$	Janeiro
	Casca externa 2	$8,85 \pm 0,38$	$0,86 \pm 0,078$	Outubro

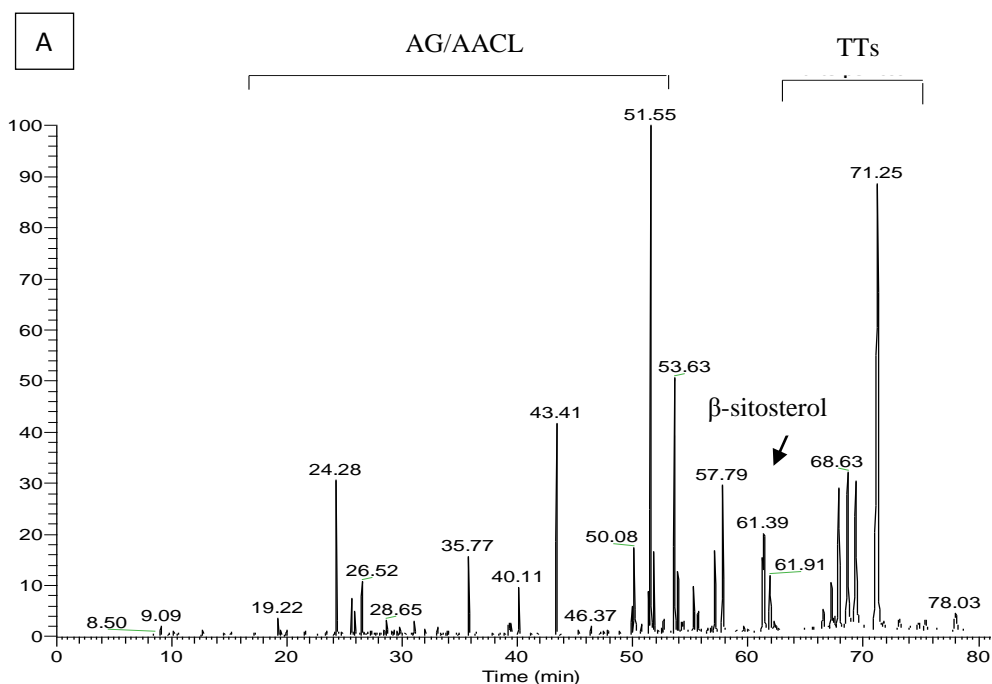
De acordo com a Tabela 4, o rendimento de extratáveis obtido para a casca externa 1 corresponde a um valor de 3,29 %. Este resultado é concordante com os valores reportados por Freire *et al.* (4) que obtiveram um rendimento de 3,93%.

A identificação dos ácidos triterpénicos foi realizada por análise dos cromatogramas (Figura 13 A) e espectros de massa (Figura 14) obtidos por GC-MS e, através das suas

áreas, confirmou-se que o ácido ursólico é o componente maioritário da casca externa 1. No Anexo A (Tabela 1) encontram-se apresentadas as áreas e a composição dos respectivos ácidos triterpénicos identificados na casca externa 1. Com base nesta análise procedeu-se ao estudo da solubilidade do ácido ursólico, abordado na **secção 3.2**, com soluções aquosas de líquidos iónicos de modo a seleccionar o catião e o anião mais adequado para, então, proceder aos processos de extração.

Devido ao término desta biomassa, foi necessário proceder a uma nova colheita durante o mês de Outubro (casca externa 2). Curiosamente, após a extração em soxhlet, observou-se uma diferença considerável na percentagem de extratáveis obtidos (Tabela 3). Esta variação poderá estar relacionada com diversos fatores, tais como o clima, o estado de desenvolvimento da planta, o *stress* hídrico, entre outros, que directa ou indirectamente influenciam a quantidade de metabolitos secundários produzidos pela própria planta.

Na Figura 13 encontram-se dois cromatogramas representativos dos extratos obtidos para a casca externa 1 (Figura 13, A) e para a casca externa 2 (Figura 13, B), onde é possível observar a presença maioritária de ácidos gordos, álcoois alifáticos de cadeia longa, esteróis e ácidos triterpénicos. Contudo, apenas a casca externa 2 foi quantificada no que concerne à quantidade de ácidos triterpénicos, uma vez que foi com esta biomassa que se realizaram os estudos de extração destes compostos (Tabela 4).



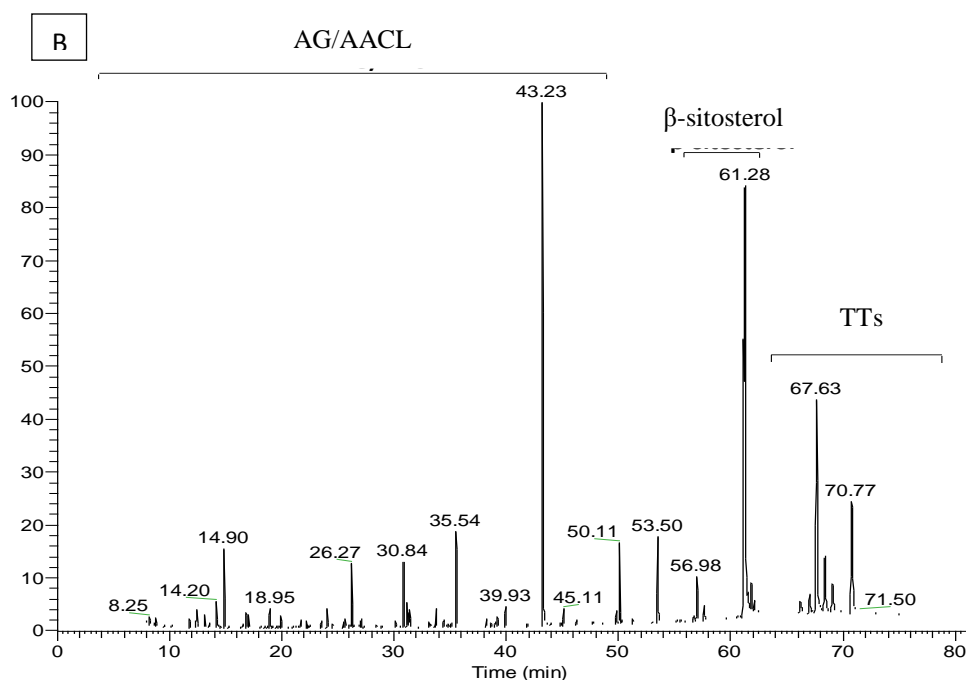


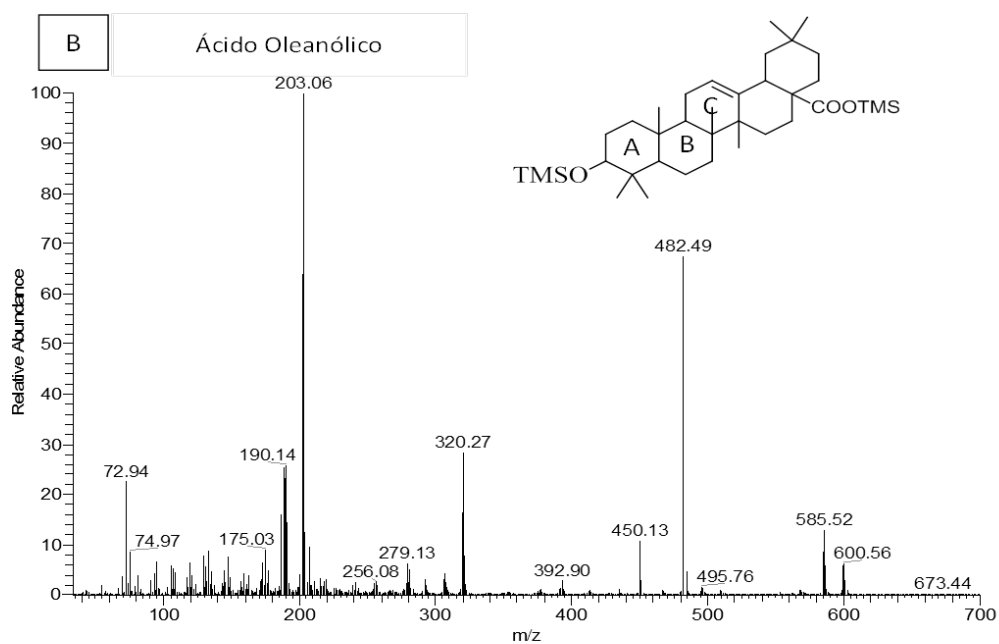
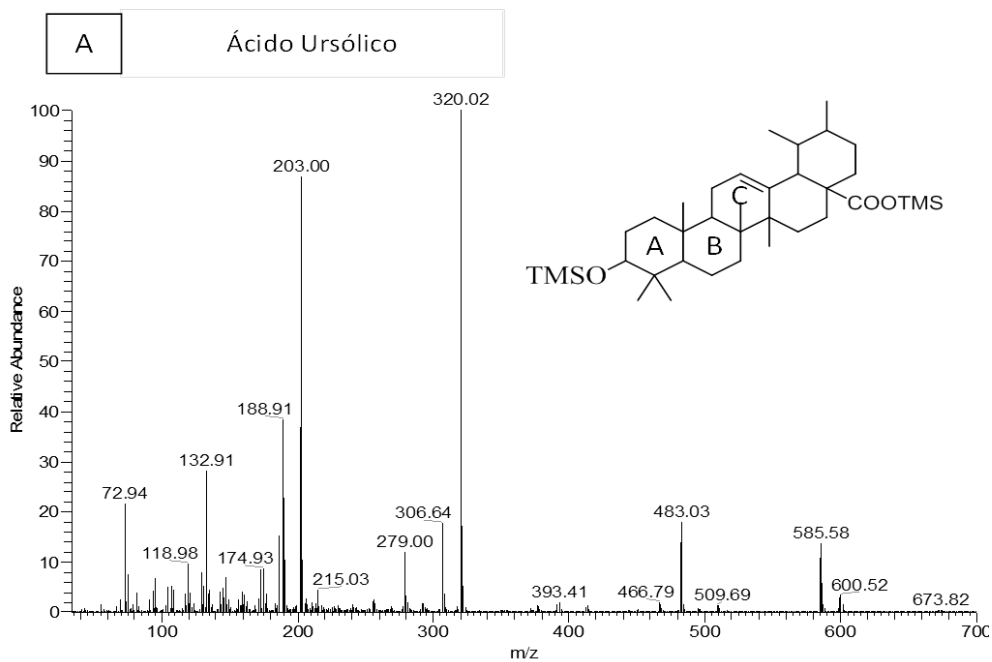
Figura 13: Cromatogramas dos extratos: [A] da casca externa 1 e [B] da casca externa 2 (ácidos gordos, AG; álcoois alifáticos de cadeia longa, AAAL e ácidos triterpênicos,TTs).

Tabela 4: Identificação dos ácidos triterpênicos (mg/kg de casca) presentes no extrato obtido a partir da casca externa 2 e respectivos tempos de retenção e quantidades obtidas.

Compostos da casca externa 2	Tempo de retenção	Composição (mg/kg de casca externa seca)
Triterpenóides		
Ácido betulínico		N.D. ¹
Ácido oleanólico		N.D. ¹
Ácido betulínico	64,47	772,22
Ácido ursólico	68,40	224,09
Ácido 3-acetil oleanólico	69,05	121,00
Ácido 3-acetil betulínico		N.D. ¹
Ácido 3-acetil ursólico	70,77	441,81
Total de compostos triterpênicos identificados		1559,12
Total de compostos detetados no extrato		6239,71

¹ N.D. = Não detectável

De acordo com a Tabela 3 e 4, o rendimento de extratáveis obtidos com diclorometano para a casca externa 2 corresponde a 0,8621 % com uma fração total de ácidos triterpênicos de 24,3% em peso seco. No entanto, contrariamente ao que é reportado na bibliografia (14), a casca externa 2 contém quantidades elevadas de ácido betulínico (0,77 g/kg), quantidades reduzidas de ácido ursólico (0,22 g/kg) e, para além disso, não foi detetada a presença do ácido oleanólico e betulínico.



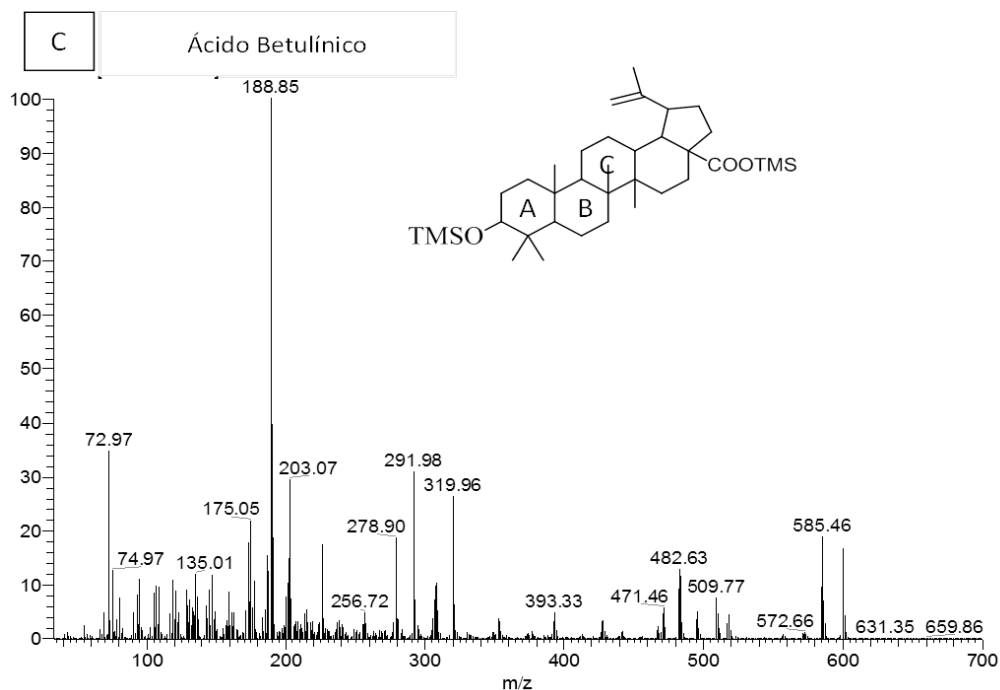


Figura 14: Espectro de massa dos ácidos triterpênicos: [A] ácido ursólico, [B] ácido oleanólico e [C] ácido betulínico.

Embora o ácido ursólico e oleanólico sejam isômeros posicionais, com estruturas muito semelhantes (Figura 14), eles podem ser facilmente distinguidos com base nos seus padrões de fragmentação e ordem de diluição (58). Apesar destes dois compostos possuírem um fragmento comum a m/z 320 nos espectros de massa, esta intensidade é superior no caso do ácido ursólico, graças à clivagem do anel C, que ocorre com maior facilidade naquele composto. No entanto, os principais íons resultantes da fragmentação destes compostos encontram-se a m/z 600 $[M]^+$, m/z 585 $[M-CH_3]$, m/z 482 $[M-COOTMS]$ e m/z 393 $(M-COOTMS-TMSO)$ (Figura 14) (58). Por sua vez, os sinais mais intensos encontram-se em m/z 320, 279, 203 e 133 sendo característicos de clivagens dos anéis A e B e, eventualmente, parte do anel C. As formas acetiladas, na posição 3, destes dois ácidos triterpênicos diferenciam-se essencialmente pelo íon molecular que surge a m/z 570 em vez de 600.

Relativamente ao ácido betulínico podem observar-se fragmentos característicos a m/z 189, 203 e 320, que correspondem à clivagem do anel C (Figura 14). Outros fragmentos relevantes do ácido betulínico encontram-se a m/z 585 e 557, referentes às perdas dos

grupos metilo e isopropilo, e a m/z 510 e 483, resultantes da perda dos grupos TMSO e COOTMS (58).

De salientar que a diferença considerável na composição das duas amostras teve obviamente impacto na conclusão do trabalho, uma vez que todo este foi desenvolvido com base na composição da amostra 1, e a fase final foi realizada com a amostra 2 com uma composição consideravelmente diferente.

3.2. Validação da quantificação dos ácidos triterpénicos por HPLC-UV

Antes de iniciar o estudo da solubilidade e dos processos de extração dos ácidos triterpénicos usando soluções aquosas de LIs, é necessário um método analítico simples, com exactidão e reprodutível para a quantificação destes compostos. Apesar dos ácidos triterpénicos serem, geralmente, quantificados por GC-MS (3,4), o uso de soluções aquosas de LIs acarreta bastantes inconvenientes neste equipamento. Por sua vez, técnicas como a espectroscopia de UV-Vis não são adequadas quando se pretende analisar misturas de compostos com perfis espectroscópicos semelhantes. Neste sentido, as técnicas cromatográficas, como o HPLC, parecem ser as mais adequados para este fim. Inclusive já foi descrita a utilização de HPLC-UV para quantificar ácido betulínico (AB) extraído de biomassa com LIs puros (51). Com base nestas informações, seleccionou-se o HPLC-UV para quantificar o ácido ursólico (AU) durante o estudo da solubilidade, assim, como para a quantificação dos ácidos triterpénicos resultantes dos processos de extração com o uso de soluções aquosas de LIs.

De forma a estudar a solubilidade do AU foi adquirido, previamente, o seu espectro de UV-Vis em metanol (Figura 15), onde se observou um máximo de absorção a 210 nm, seleccionando-se este comprimento de onda para a sua deteção por HPLC-UV. Deve-se salientar que o AU é uma molécula muito pouco solúvel em água, razão pela qual se utilizaram soluções de metanol. Apesar de na bibliografia não se ter encontrado nenhuma informação disponível sobre a sua solubilidade em água, alguns estudos reportaram que a solubilidade do AB em água é cerca de 2×10^{-5} g/L (35) a 25 °C e, com base nesta informação, admitiu-se que a solubilidade do AU seria da mesma ordem de grandeza.

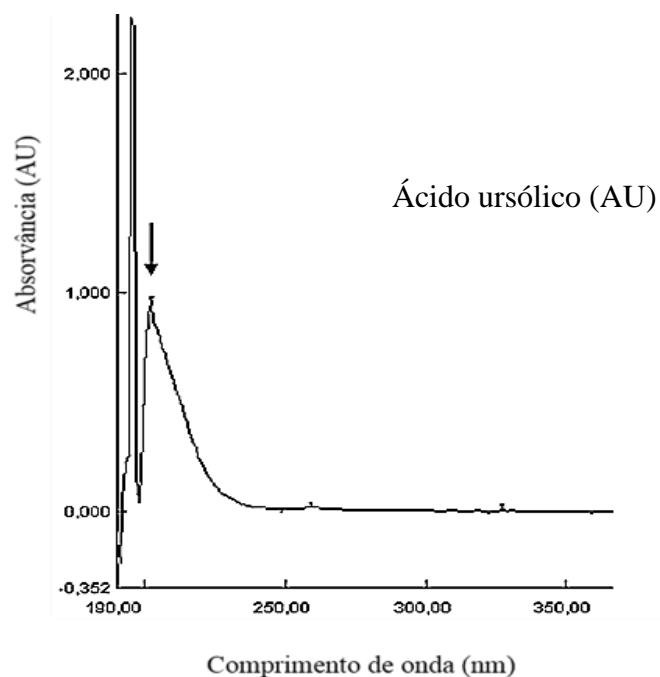


Figura 15: Espectro de absorção do AU em metanol na região UV.

De seguida, através de uma concentração conhecida de ácido ursólico numa solução aquosa de $[C_{14}C_{1}im]Cl$ a 500 mM, as condições de HPLC foram optimizadas no que diz respeito à composição da fase móvel e caudal. Primeiramente, foram estudados diferentes solventes (acetonitrilo, metanol, solução aquosa de TFA e uma solução aquosa de tampão fosfato). A fase móvel composta por metanol e solução aquosa de TFA (0,1%) num gradiente de 87:13 (v/v) mostrou ser a mais adequada relativamente à identificação e à resolução do pico de AU. Posteriormente, a resolução do pico do AU foi optimizado através do ajuste da taxa de fluxo da fase móvel; observou-se que à medida que se aumenta o fluxo da fase móvel, o tempo de retenção reduz significativamente, bem como a resolução do pico. As condições isocráticas estabelecidas para o HPLC permitiram, desta maneira, uma boa separação e quantificação do AU.

A curva de calibração do AU foi determinada numa gama de concentrações compreendida entre 0,0005 e 1 mg/mL, que está representado no **Anexo A1** (Figura 1). Com base na curva de calibração, o limite de deteção (LOD) e quantificação (LOQ) foram estimados fornecendo informações sobre qual a menor concentração de AU que pode ser distinguida do sinal/ruído e a concentração quantificável mais baixa (Tabela 5).

Tabela 5: Equação da curva de calibração do ácido ursólico (área *versus* concentração), coeficiente de correlação (R^2), limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) e respectivo tempo de retenção.

<i>Gama linear (mg/mL)</i>	<i>Curva de calibração</i>	R^2	<i>LOD / (mg/mL)</i>	<i>LOQ / (mg/mL)</i>	<i>Tempo de retenção / min</i>
0.005-1	$Y=18091584,20x+13269,38$	0,9998	0,017	0,056	11,23 ±0,04

Após a otimização das condições de análise, as amostras de concentrações conhecidas (0,056; 0,5; 1,0 e 1,5 mg/mL) de ácido ursólico em soluções aquosas de 500 mM de $[C_{14}C_{1im}]Cl$ foram quantificadas, através da curva de calibração, previamente estabelecida e, comparadas com a concentração real de forma a avaliar a exactidão e precisão do método analítico. As amostras de concentração conhecida em soluções aquosas de $[C_{14}C_{1im}]Cl$ foram injetadas e quantificadas em triplicado. A Tabela 6 indica que o método desenvolvido por HPLC-UV é preciso e fiável evidenciando o grau de proximidade bastante elevado entre a concentração de AU quantificada e o valor real.

Tabela 6: Resultados de precisão (% RSD), da exactidão (% ER) e tempos de retenção do ácido ursólico.

Ensaio	Repetibilidade (n=3)			
	C_{determinada} / (mg/mL)	RSD (%)	ER (%)	Tempo de retenção / min
0,056 (LOQ)	0,057 ± 0,001	1,96	3,19	11,37 ± 0,07
0,510	0,520 ± 0,015	2,94	0,90	11,33 ± 0,06
1,010	1,026 ± 0,023	2,26	0,99	11,30 ± 0,07
1,520	1,531 ± 0,014	0,93	0,96	11,37 ± 0,07

RSD (%)= (Desvio padrão/média) x100

ER (%)= ((média da concentração determinada- concentração real)/concentração real) x 100

É importante realçar, que ácido ursólico foi inicialmente escolhido por existir em maior quantidade na casca externa 1. No entanto, e de forma a garantir a correta separação e quantificação dos três ácidos triterpénicos identificados na casca externa de eucalipto foram determinadas também curvas de calibração para os ácidos betulínico e oleanólico. Na Tabela 7 estão representados os tempos de retenção dos diferentes padrões e no **Anexo**

A1 estão representadas (Figura 1, 2 e 3) as curvas de calibração dos três ácidos triterpênicos.

Tabela 7: Média e desvio padrão dos tempos de retenção do ácido betulínico, oleanólico e ursólico para as soluções padrão em metanol.

<i>Ácidos Triterpênicos</i>	<i>Tempos de retenção / RSD (%)</i>	
	<i>min</i>	
Ácido betulínico	9,96 ± 0,05	0,49
Ácido oleanólico	10,84 ± 0,35	0,36
Ácido ursólico	11,23 ± 0,04	0,34

As condições isocráticas estabelecidas para o método de HPLC-UV permitiram: i) uma boa separação e quantificação do ácido ursólico, e ii) uma separação adequada entre os ácidos ursólico, oleanólico e betulínico.

3.3. Solubilidade do ácido ursólico

3.3.1. Efeito da estrutura dos líquidos iônicos de cadeia alquílica curta

Esta etapa teve como objetivo: i) avaliar a solubilidade do AU em soluções aquosas de LIs, ii) compreender o comportamento de solvatação (por hidrotropia ou surfactante) das soluções aquosas de LIs durante a solubilização do AU, e iii) selecionar o(s) LI(s) mais adequado(s) para extrair ácidos triterpênicos da casca de *E. globulus*.

Numa primeira abordagem e tendo como base o trabalho publicado por Cláudio *et al.* (56) que mostrou a excelente capacidade hidrotrópica de um conjunto de soluções aquosas de LIs na solubilização de duas biomoléculas (vanilina e ácido gálico), os ILs inicialmente selecionados para este trabalho foram o [C₄C₁im][N(CN)₂], [C₄C₁im][TOS], [C₄C₁im][SCN], [C₄C₁im][C₂H₅SO₄], [C₄C₁py][N(CN)₂] e [C₄C₁pyrr]Cl (Tabela 8). No entanto, por HPLC-UV não se detectou nenhum sinal correspondente ao composto alvo nestas soluções (LIs a 750 e 1000 m M). Contudo, deve-se mencionar que, estruturalmente, o AU e esses dois compostos fenólicos são bastantes diferentes e, para além disso, enquanto o primeiro é uma molécula bastante hidrofóbica, os segundos

apresentam uma solubilidade moderada em água (solubilidade da vanilina = 12.78 g/L e ácido gálico = 12.14 g/L à temperatura ambiente) (56).

Uma vez que com as outras soluções aquosas dos LIs, descritos anteriormente, não se conseguiu observar nenhum aumento na solubilidade do AU, outra abordagem foi utilizada com base no artigo publicado por Ressmann *et al.* (51). Os autores (51) extraíram ácido betulínico com um LI puro - [C₂C₁mim][CH₃CO₂]. Deste modo, efetuou-se um novo ensaio de solubilidade com uma solução aquosa de [C₂C₁mim][CH₃CO₂] a 750 e 1000 mM saturado com AU onde, mais uma vez, não foi detetado nenhum pico. A Tabela 8 resume as diferentes soluções aquosas de LI's estudadas e incapazes de solubilizar ácido ursólico a uma concentração superior ao limite de detecção do HPLC-UV utilizado.

Tabela 8: Diferentes soluções aquosa de líquidos iônicos de cadeia curta estudados (em solução aquosa entre 750 e 1000 mM) na dissolução do UA.

Soluções aquosas de líquidos iônicos de cadeia curta (750 e 1000 mM)
[C ₂ C ₁ im][CH ₃ CO ₂]
[C ₄ C ₁ py][N(CN) ₂]
[C ₄ C ₁ pyrr]Cl
[C ₄ C ₁ im][TOS]
[C ₄ C ₁ im][N(CN) ₂]
[C ₄ C ₁ im][SCN]
[C ₄ C ₁ im][C ₂ H ₅ SO ₄]

Perante as estruturas dos LIs testados (Tabela 8) concluiu-se que a hidrotropia não é um fenómeno relevante na dissolução do AU. Assim, de seguida, foi avaliado o efeito do aumento da cadeia alquílica do LI, nomeadamente com soluções aquosas de [C₄C₁im][TOS] e [C₈C₁im]Cl) a uma concentração de 750 mM, a que se adicionou uma pequena quantidade de AU. Este ensaio permitiu observar que um LI com uma cadeia alquílica maior, neste caso o [C₈C₁im]Cl, tornava a solução menos turva e, portanto, conseguia dissolver melhor o AU que o [C₄C₁im][TOS], como observado na Figura 16.

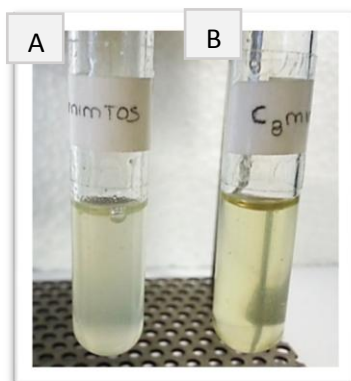


Figura 16: Dissolução de AU em soluções aquosas de LIs de: [A] $[C_4C_1im][TOS]$ e [B] $[C_8C_1im]Cl$.

Com base nesta observação inferiu-se que o aumento da cadeia alquílica do LI faz aumentar a solubilidade do AU em solução aquosa, sugerindo que o carácter anfifílico dos LIs tem um papel relevante. Desta forma, o passo seguinte consistiu no estudo da solubilidade do ácido ursólico em soluções aquosas de LIs de cadeia longa.

3.3.2. Efeito da concentração e da estrutura dos líquidos iónicos de cadeia alquílica longa

O estudo da solubilidade do AU foi avaliado para um conjunto de soluções aquosas de LIs à base de sais alquilmetilimidazólios de cadeia longa ($[C_nC_1im]Cl$ com $n = 8, 10, 12, 14, 16$ e 18), com características de tensioactivos conhecidas (54,59,60), bem como um LI derivado de um fosfónio quaternário ($[P_{444,14}]Cl$), numa gama alargada de concentrações (de 50-1000 mM). A Figura 17 representa as curvas de solubilidade do AU nas diferentes soluções aquosas de LI testadas à temperatura de 25 °C.

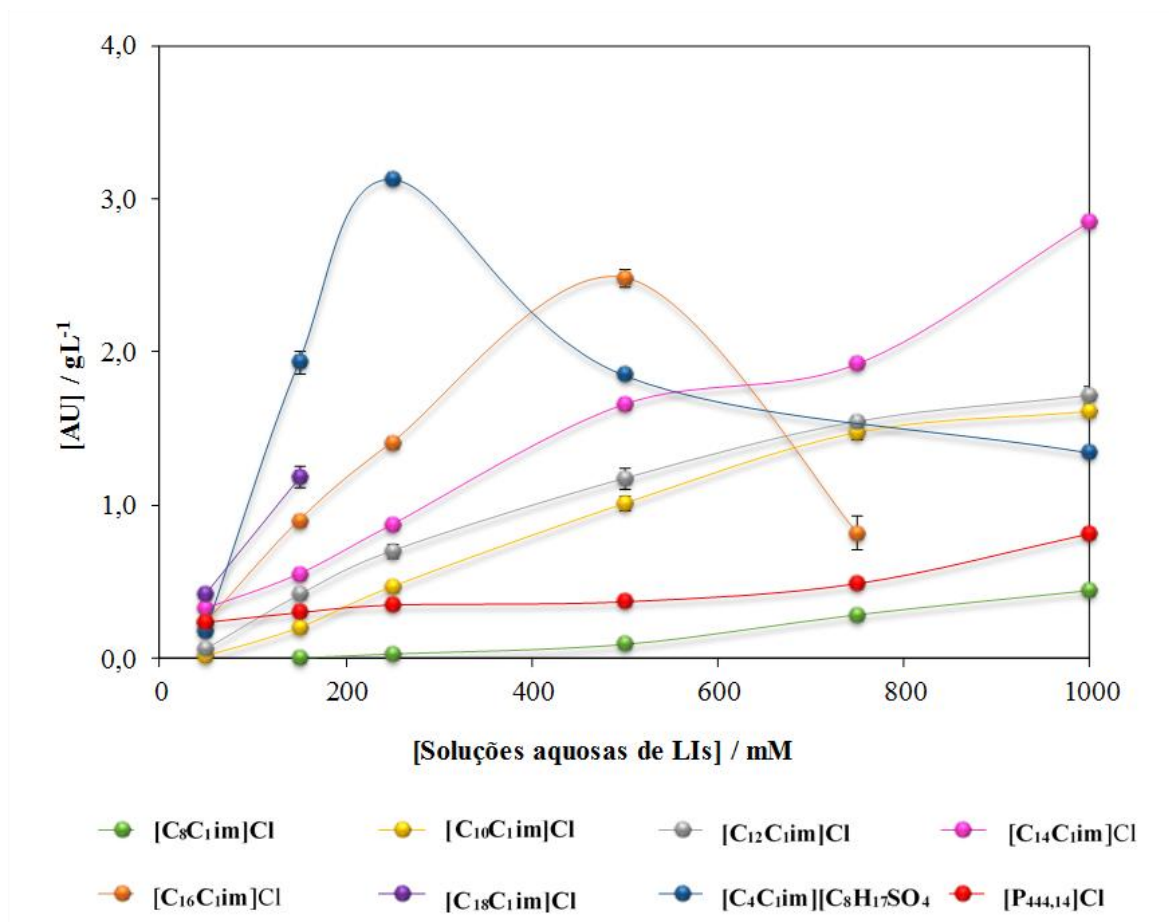


Figura 17: Influência da concentração e da estrutura dos líquidos iônicos sobre a solubilidade do ácido ursólico à temperatura de 25 °C.

De acordo com os resultados da Figura 17, as soluções aquosas de LIs mostraram, de um modo geral, um bom desempenho em solubilizar o AU. Entre as demais, as soluções aquosas de LIs que se destacaram foram as de $[C_4C_1im][C_8H_{17}SO_4]$, $[C_{16}C_1im]Cl$ e de $[C_{14}C_1im]Cl$. Desta forma, pode-se concluir que, por exemplo, uma solução de 250 mM de $[C_4C_1im][C_8H_{17}SO_4]$ aumenta cerca de 15650 vezes a solubilidade do AU em solução aquosa (assumindo a solubilidade do ácido betulínico à mesma temperatura tal como descrito anteriormente), refletindo o elevado potencial de soluções aquosas de LIs para a extração deste composto.

De um modo geral, quanto maior é a cadeia alquílica do LI do catião, maior é a sua capacidade de solubilizar o AU (Figura 17), contudo, foram observados problemas associados à viscosidade durante a preparação de soluções de LIs de cadeia alquílica longa. Por exemplo, durante a preparação das soluções aquosas de $[C_{18}C_1im]Cl$ saturadas com

AU verificou-se que acima de 150 mM estas apresentam um aspeto gelatinoso (Figura 18), impedindo, desta forma, a sua posterior quantificação por HPLC.



Figura 18: Aspeto gelatinoso das soluções aquosas de $[C_{18}C_1im]Cl$ a 250 e 500 mM

Com base no carácter anfifílico dos LIs estudados, que são estruturalmente semelhantes aos surfactantes iónicos (Figura 19), determinou-se experimentalmente a concentração micelar crítica (CMC) através de condutividade. Os gráficos resultantes destas medições encontram-se no **Anexo 3A** (Figura 1) e os dados das CMCs medidos estão descritos na Tabela 9.

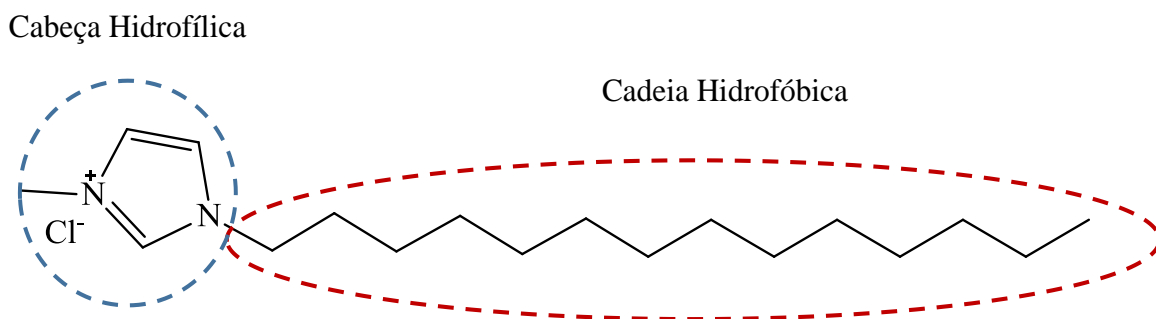


Figura 19: Estrutura molecular do cloreto de 1-metil-3-tetradecilimidazólio ($[C_{14}C_1im]Cl$).

Tabela 9: Valores de condutividade reportados na literatura e obtidos experimentalmente, ambos foram determinados por condutividade a uma temperatura de 25 °C.

	<i>CMC</i>	
	Valores da literatura (referência)	Valores experimentais
$[\text{C}_{10}\text{C}_1\text{im}]\text{Cl}$	57,20 (61)	58,70
	55 (59)	
	62,00 (60)	
	40,47 (62)	
$[\text{C}_{12}\text{C}_1\text{im}]\text{Cl}$	15,10 (59,63)	15,20
	14,00 (60)	
	13,47 (62)	
$[\text{C}_{14}\text{C}_1\text{im}]\text{Cl}$	3,68 (62)	3,90
	3,80 (60)	
	4,00 (59)	
$[\text{C}_{16}\text{C}_1\text{im}]\text{Cl}$	1,14 (59)	0,95
	0,86 (59,62)	
$[\text{C}_{18}\text{C}_1\text{im}]\text{Cl}$	0,40 (61)	0,30
	0,45 (59)	
$[\text{C}_4\text{C}_1\text{im}][\text{C}_8\text{H}_{17}\text{SO}_4]$	31,00 (64)	43,30
$[\text{P}_{444,14}]\text{Cl}$	Não disponível	260,00

Por análise da Tabela 9 observou-se que os valores de CMC determinados se encontram na faixa de intervalos com os valores reportados na literatura, com a exceção do $[\text{C}_4\text{C}_1\text{im}][\text{C}_8\text{H}_{17}\text{SO}_4]$. No entanto, para este LI, apenas, foi encontrado um valor de referência de CMC e, para além disso, nenhuma informação foi encontrada sobre o $[\text{P}_{444,14}]\text{Cl}$. Desta forma, determinou-se por tentativa erro o CMC deste LI tendo como referência a curva de solubilidade do AU uma vez que esta permitiu indicar se a sua CMC estaria muito próximo do CMC do $[\text{C}_8\text{C}_1\text{im}]\text{Cl}$ e $[\text{C}_{10}\text{C}_1\text{im}]\text{Cl}$.

Ainda, foi possível observar que à medida que a cadeia alquílica do catião aumenta, o valor da CMC diminui, Figura 20. Este resultado é o esperado uma vez que, quanto mais longa a cadeia hidrofóbica maior a tendência para a organização das moléculas em água,

promovendo mais rapidamente a sua associação resultando, assim, na formação de agregados (Figura 21).

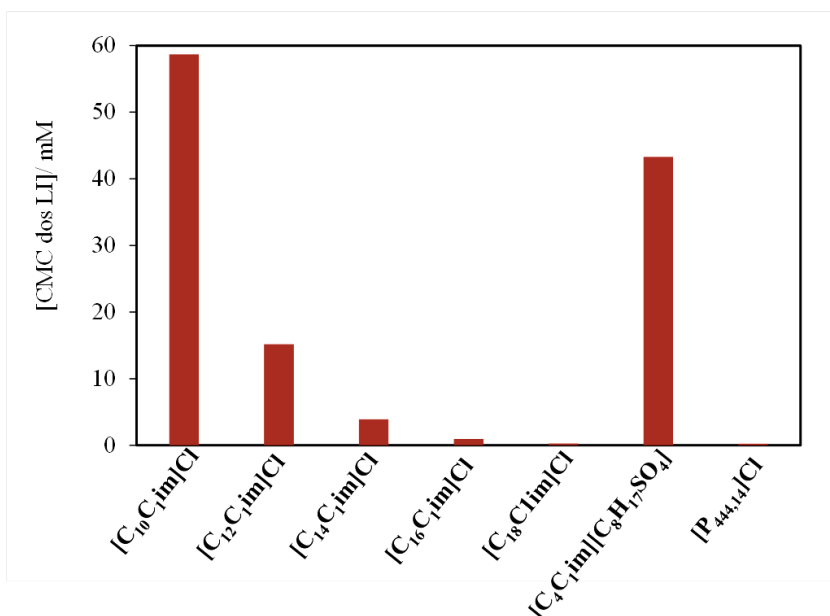


Figura 20: Influência da cadeia alquílica na formação de agregados micelares

Com base nos valores de CMC apresentados na Tabela 9 e na estrutura anfifílica dos diferentes LIs, é possível justificar que o aumento da solubilidade do AU deveu-se à formação de agregados micelares (Figura 21). Na verdade, vários autores já demonstraram a formação de micelas de LIs em soluções aquosas (55,60–65) e a sua aplicação para a extração de produtos de valor acrescentado a partir da biomassa.

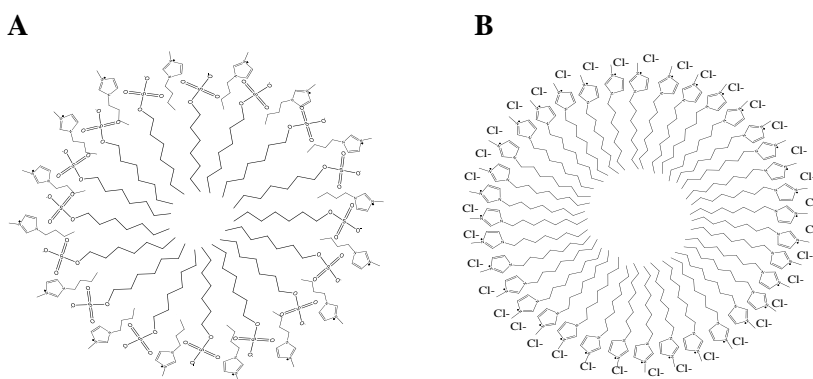


Figura 21: Exemplo de alguns agregados micelares: [A] [C₄mim][C₈H₁₇SO₄] e [B] [C₁₆C₁im]Cl.

O pH de cada solução aquosa de LI foi determinado a uma concentração de 500 mM (à exceção do $[C_{18}C_{1im}]Cl$) (Figura 22) de modo a se verificar a influência deste parâmetro na solubilidade do AU.

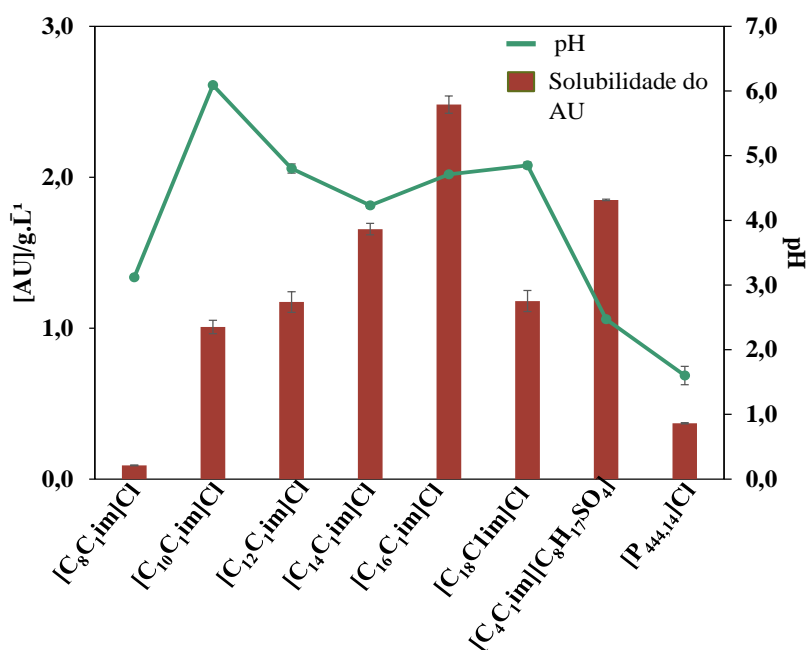


Figura 22: Solubilidade do ácido ursólico utilizando soluções aquosas dos de líquidos iônicos a uma concentração de 500 mM (à exceção do $[C_{18}C_{1im}]Cl$, a 150 mM) e o respetivo pH.

Segundo os resultados apresentados na Figura 22, pode-se verificar que à medida que a cadeia alquílica aumenta o pH têm uma tendência em diminuir a solubilidade do AU. No entanto, o pH de todas as soluções de LIs (à exceção do $[C_{10}C_{1im}]Cl$) está abaixo do pK_a do AU ($pK_a = 4,90$) logo, o AU encontra-se maioritariamente na sua forma neutra (66). No entanto, não se verifica qualquer correlação ou efeitos do pH sobre a solubilidade do AU.

3.3.3. Comparação da solubilidade do ácido ursólico em soluções de surfactantes convencionais e soluções aquosas de líquidos iônicos

Tendo-se verificado que a dissolução do AU em soluções aquosas de LIs está relacionada com a formação de agregados micelares, considerou-se nesta fase testar a sua solubilização utilizando surfactantes convencionais, tais como o dodecilsulfato de sódio (SDS), dodecilfenil sulfato de sódio (SDBS) e o brometo de hexadeciltrimetilamonio (CTAB). Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura 23.

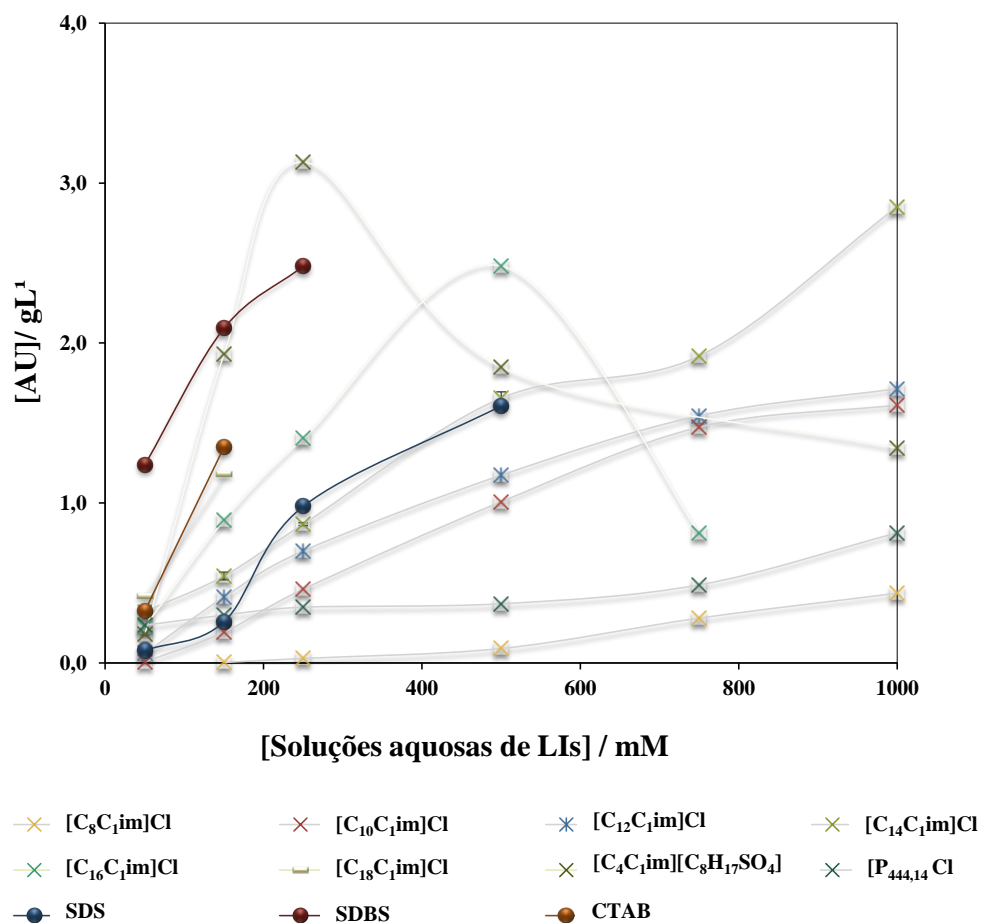


Figura 23: Solubilidade de AU em soluções aquosas de líquidos iônicos e surfactantes convencionais a 25°C.

De acordo com os resultados obtidos (Figura 23), observou-se um aumento significativo da solubilidade do AU nas diferentes soluções aquosas de surfactantes convencionais, em particular com o SDBS a 50 mM. A esta concentração, a solubilidade do AU aumentou cerca de 62000 vezes em água, enquanto que em soluções de [C₄C₁im][C₈H₁₇SO₄] a 50 mM aumentou cerca de 8950 vezes. Desta forma, concluiu-se que os surfactantes convencionais mostraram ser bastantes satisfatórios em aumentar a solubilidade do AU a baixas concentrações. Contudo, não se conseguiu preparar soluções dos surfactantes SDS, CTAB e SDBS a concentrações mais elevadas devido à sua pouca solubilidade em água (solubilidade em água do SDS corresponde a 150 g/L (38), do CTAB a 36,4 g/L (39) e do SDBS não foram encontrados dados disponíveis na literatura). Por sua vez, com as soluções aquosas de LI's conseguiu-se garantir soluções líquidas numa gama alargada de

concentrações. Além disso, uma das grandes vantagens com o uso destes sais iônicos deve-se à facilidade de recuperação do compostos de interesse como abordado na **secção 3.4**.

3.4. Recuperação do ácido ursólico a partir de soluções aquosas de líquidos iônicos

O estudo da solubilidade do ácido ursólico em diferentes soluções aquosas de LIs é um factor importante de modo a maximizar a eficiência de extração, como também para otimizar a posterior recuperação deste composto a partir das mesmas soluções. Uma vez que a solubilidade do AU em água é muito baixa, a sua recuperação a partir de soluções aquosas de LI pode ser facilmente conseguida por adição de água, como anti-solvente. Para confirmar a eficiência desta abordagem, preparou-se uma solução aquosa de $[C_4C_1im][C_8H_{17}SO_4]$ a 250 mM com 2,5 mg/mL de AU, à temperatura ambiente (Figura 24). A posterior adição de água, com objetivo de diminuir a concentração do LI, permitiu demonstrar a formação de um precipitado, (Figura 24) que foi, seguidamente, recuperado por filtração e lavado várias vezes com água fria. A diminuição da concentração da solução aquosa de LI a partir de 250 mM para 50 mM permitiu recuperar 89 % do AU relativamente ao valor inicial.

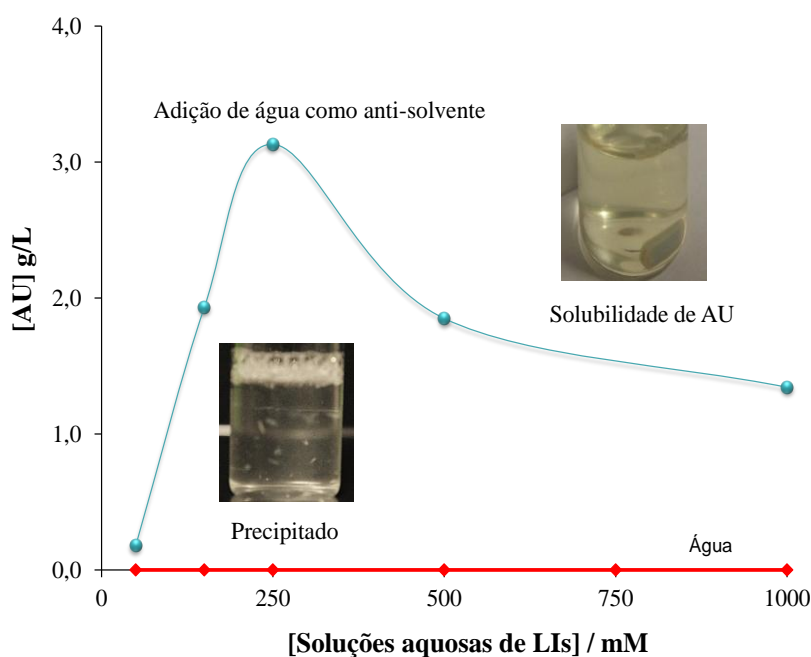


Figura 24: Ácido ursólico dissolvido numa solução aquosa de $[C_4C_1im][C_8H_{17}SO_4]$ a 250 mM e, formação de um precipitado resultante da adição de água.

Este ensaio permitiu confirmar a possibilidade de recuperar o AU a partir das soluções aquosas de líquidos iônicos após a extração, apenas, por adição de água como anti-solvente. Além disso, esta estratégia pode ser aplicada para recuperar os compostos de valor acrescentado extraídos a partir da biomassa usando soluções aquosas de LIs.

Em suma, o estudo da solubilidade do ácido ursólico permitiu, assim, elucidar sobre qual o melhor LI a ser empregue nos processos de extração dos ácidos triterpênicos a partir da casca externa do eucalipto. Apesar da solução aquosa de $[C_4C_1im][C_8H_{17}SO_4]$ a 250 mM se ter destacado na solubilização do AU (Figura 17), por questões económicas e de síntese mais demorada, o $[C_{16}C_1im]Cl$ e $[C_{14}C_1im]Cl$ mostraram ser os LIs mais convenientes a ser utilizados nos processos de extração abordados na **Secção 3.4**. Contudo, entre estes dois últimos, o $[C_{14}C_1im]Cl$ foi o LI selecionado, não só pelas quantidades disponíveis no laboratório, como também pelo fato de possuir uma menor cadeia alquílica e, assim, uma menor viscosidade.

3.5. Extração dos ácidos triterpênicos a partir da casca externa de *E. globulus* usando soluções aquosas de líquidos iônicos

Uma vez identificadas as soluções aquosas de LIs mais promissoras para solubizar o AU (Figura 17), assumiu-se que estas são também as mais promissoras para a solubilização dos restantes ácidos triterpênicos, e respetiva extração a partir da casca de *E. globulus*. Contudo, deve-se ter em conta que, durante a caracterização das amostras da casca externa 2, observou-se a presença maioritária de AB (0,77 g/kg), seguida de AU (0,22 g/kg) e a ausência de ácido oleanólico.

Com o objetivo de extrair os dois ácidos triterpênicos existentes a partir da casca de eucalipto selecionou-se uma solução aquosa de $[C_{14}C_1im]Cl$ a 750 mM, como referindo anteriormente. Para comparação foi realizada, também, a extração dos ácidos triterpênicos com metanol (apesar do diclorometano ser o solvente mais comum para extrair estes compostos devido à sua maior elevada volatilidade optou-se pelo metanol). As condições operacionais foram idênticas para cada solvente, ou seja, uma razão sólido-líquido ($R_{S/L}$) de 1:10 de casca:solvente e com um tempo de extração de 1 e 4 horas. No entanto, a temperatura de extração variou, enquanto para as soluções aquosas $[C_{14}C_1im]Cl$ a 750 mM a temperatura utilizada foi de 70° C, para o metanol foi de 40° C (uma vez que a temperatura de ebulição deste é 64,7 °C) (66). Após a extração, cada solução foi filtrada e

injetada no HPLC-UV. Estas condições de extração foram estabelecidas de acordo com o trabalho realizado por Cláudio *et al.* (53) que mostraram uma boa eficiência na extração de cafeína a partir de sementes de guaraná.

A identificação dos picos correspondentes aos ácidos triterpênicos foi efetuada por comparação dos tempos de retenção (Tabela 11) e por intensificação do sinal de uma amostra-teste com padrões dos ácidos ursólico, betulínico e oleanólico.

Tabela 10: Tempos de retenção do ácido betulínico e ácido ursólico.

Compostos	Tempos de retenção / min			
	Extração com metanol a 40 °C		Extração com solução aquosa de LI a 70 °C	
	1 Hora	4 Horas	1 Hora	4 Horas
AB	9,98 ± 0,02	9,93 ± 0,07	9,92 ± 0,05	9,88 ± 0,01
AU	11,01 ± 0,03	10,99 ± 0,03	10,90 ± 0,03	10,92 ± 0,02

Na Figura 25 está apresentado os rendimentos de extração dos ácidos triterpênicos (AB e AU) em soluções aquosas de $[C_{14}C_1im]Cl$ a 750 mM e metanol. De forma a comparar com a técnica usada para extrair estes compostos, utilizou-se como valores de referência os rendimentos dos ácidos triterpênicos obtidos em soxhlet com diclorometano.

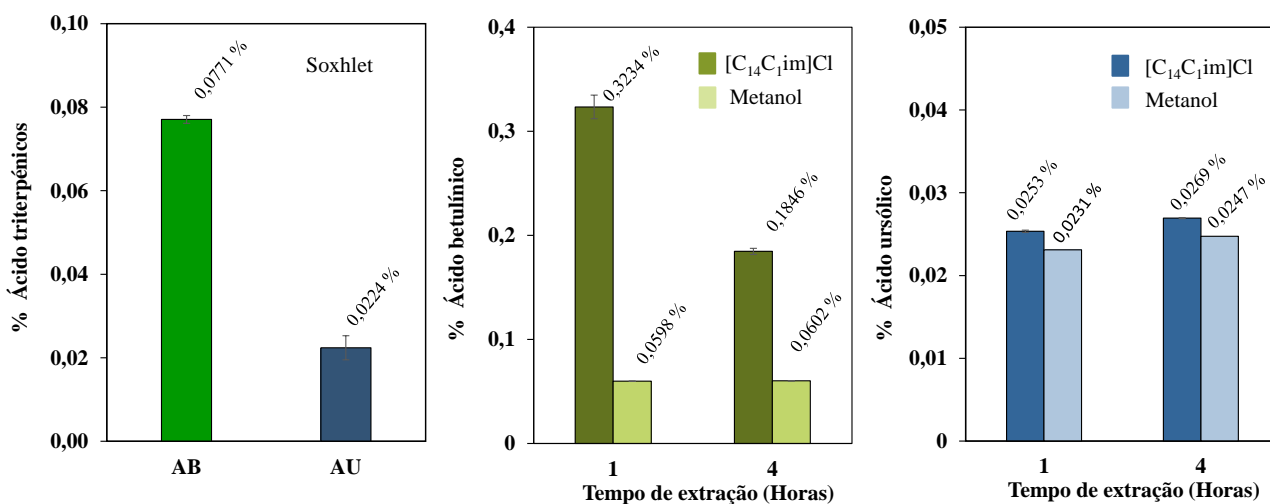


Figura 25: Rendimentos de extração obtidos por: [A] soxhlet com diclorometano, e [B] ácido betulínico (AB) e [C] ácido ursólico (AU) a partir da casca de eucalipto 2 utilizando uma solução aquosa de $[C_{14}C_1im]Cl$ a 750 mM e metanol.

De acordo com os resultados, observou-se que as soluções aquosas de LIs mostraram um bom desempenho em extrair os ácidos triterpênicos (AB e AU) quando comparado com o metanol e com o diclorometano (extração em soxhlet). Todas as extracções efectuadas mostraram a existência de uma maior quantidade de AB do que do AU nas amostras da casca externa 2.

Os rendimentos de extração do AB e AU representaram 0,08 e 0,02 % do teor estimado com base na extração com diclorometano (DCM). No entanto, a partir da Figura 25 foi possível verificar que as soluções aquosas de $[C_{14}C_1im]Cl$ a 750 mM mostraram ser mais eficientes em extrair estes dois compostos, particularmente, o AB com um rendimento de 0,32 % durante 1 hora. Contudo, uma redução no seu rendimento foi observada entre os tempos de 1 a 4 horas, sendo este um resultado não espèctavel. Em contrapartida, não se observou nenhuma variação significativa nos rendimentos do AU quando se usou soluções aquosas de $[C_{14}C_1im]Cl$ e metanol entre 1 e 4 hora (Figura 25,C). Face aos resultados obtidos, claramente, são necessários mais ensaios futuros na extração destes compostos com o uso de soluções aquosas de LIs.

De forma a complementar os dados obtidos, foi realizada uma extração sequencial, com uma solução aquosa de $[C_{14}C_1im]Cl$ a 750 mM a 70 °C de 1 a 4 h, seguida de metanol a 40 °C de 1 a 4 h, respetivamente . Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura 27.

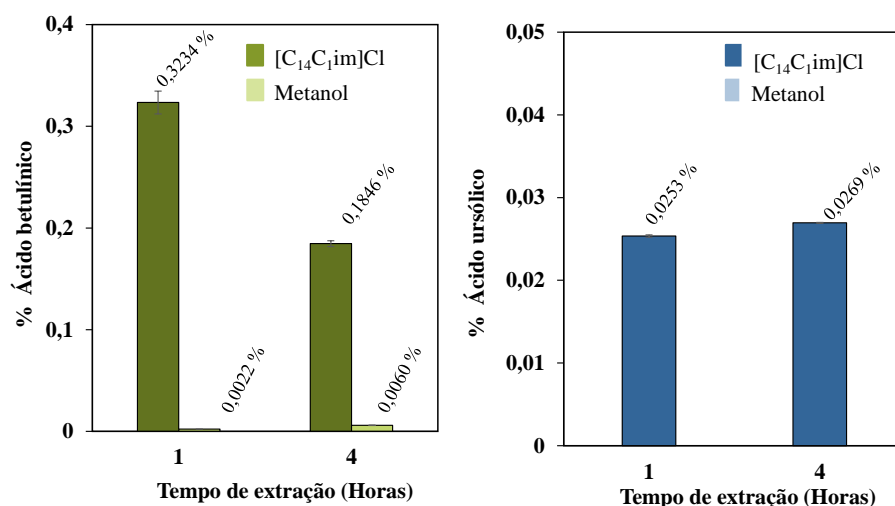


Figura 26: Rendimentos de extração de [A] ácido betulínico e [B] ácido ursólico a partir da casca de eucalipto com soluções aquosas de $[C_{14}C_1im]Cl$ seguida de extração com metanol.

Na Figura 26, observou-se que após a extração sucessiva das amostras com metanol apenas se verificam alguns vestígios de AB (Figura 26,A) e nada foi observado relativamente ao AU (Figura 26,B). evidenciando assim a boa capacidade das soluções aquosas $[C_{14}C_1im]Cl$ para extrair estes compostos. Desta forma, é possível prevêr que estes solventes extraem eficazmente os compostos triterpênicos da casca de eucalipto.

3.6. Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)

Com o objetivo de avaliar o impacto das extrações sobre a morfologia da biomassa foram adquiridas imagens de SEM da amostra apenas triturada (sem nenhum tipo de extração - branco) e dos resíduos sólidos das extrações com metanol, com solução aquosa de $[C_{14}C_1im]Cl$ e ainda da extração sequencial com $[C_{14}C_1im]Cl$ e metanol. As quatro amostras estão representadas na Figura 27.

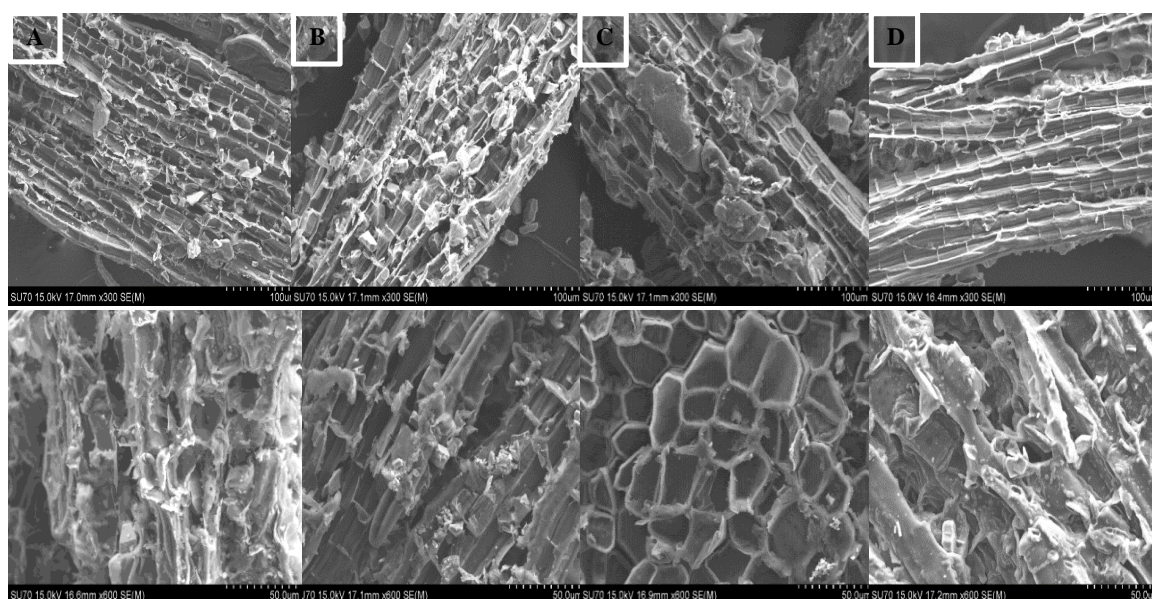


Figura 27: Imagens de SEM das amostras de casca [A] não sujeitadas a extração; após a extração com: [B] metanol, [C] solução aquosa de $[C_{14}C_1im]Cl$ e [D] re-extração com metanol.

As imagens de SEM não mostraram ser muito conclusivas, uma vez que não se verificou nenhuma alteração morfológica significativa entre as diferentes amostras tanto para as amostras que sofreram extração como a original. Portanto, pode-se inferir que o

rompimento das células observado na Figura 27 deriva de um processo mecânico (momento em que foram tratadas com azoto e trituradas) e não devido aos solventes.

4. Conclusão Final

A presente tese teve como objetivo a extração de ácidos triterpênicos (AU, AB e AO) da casca externa de *E. globulus*, recorrendo a soluções aquosas de líquidos iônicos. Para tal, o trabalho envolveu 4 etapas fundamentais: 1) caracterização prévia da casca externa do *E. globulus* utilizando diclorometano; 2) desenvolvimento do método analítico para quantificação; 3) estudo da solubilidade do AU em diferentes soluções aquosas de LIs e comparação com surfactantes convencionais, e 4) extração dos ácidos triterpênicos da casca de eucalipto utilizando soluções aquosas de $[C_{14}C_1im]Cl$, metanol e extração sucessiva destes dois compostos.

Em relação à primeira etapa, duas colheitas de biomassa foram realizadas (em Janeiro e em Outubro de 2015) e as amostras resultantes foram devidamente caracterizadas, observando-se uma variação significativa na sua composição, essencialmente, no que concerne à quantidade de ácidos triterpênicos. Verificando-se, assim, que a segunda amostra apresentava uma composição substancialmente diferente da habitual. As condições isocráticas estabelecidas para o métodos de HPLC-UV permitiram uma boa separação e quantificação dos ácidos triterpênicos em soluções aquosas de LIs.

Desta forma, através do estudo da solubilidade do AU foi possível confirmar que LIs com atividade surfactante são os mais promissores no aumento da solubilidade deste composto em solução aquosa. Os melhores resultados foram obtidos com soluções de $[C_4C_1im][C_8H_{17}SO_4]$, $[C_{16}C_1im]Cl$ e $[C_{14}C_1im]Cl$ onde, por exemplo, a solução aquosa de $[C_4C_1im][C_8H_{17}SO_4]$ aumentou cerca de 16000 vezes a sua solubilidade em água. Apesar dos surfactantes convencionais terem mostrado ser mais eficazes em solubilizar este composto, num intervalo de concentrações mais baixas, as soluções aquosas de LIs permitiram o seu estudo numa gama mais alargada. Além disso, foi demonstrado que é possível precipitar/recuperar cerca de 89 % de AU por simples adição de água

Com base nos resultados anteriores, selecionou-se o $[C_{14}C_1im]Cl$ para os ensaios de extração, uma vez que é o mais barato, mais fácil de sintetizar e encontrava-se em maior quantidade no laboratório. Os resultados obtidos nos processos de extração mostraram um o seu bom desempenho em extrair o AB e AU (0,32 e 0,26% durante 1h ,respetivamente) em relação ao metanol e ao soxhlet realizado com diclorometano. Além disso, através das extracções sucessivas, verificou-se que o $[C_{14}C_1im]Cl$ extraía todo o AU existente na amostra e quase todo o AB.. Contudo, os ensaios de extração devem ser mais alargados no futuro de forma a inferir quais as condições de extração.

5. Trabalho Futuro

Com vista a uma futura valorização da casca externa de *Eucalyptus globulus* como fonte de ácidos triterpénicos seria pertinente estudar ainda:

- i. A solubilidade dos três ácidos triterpénicos em soluções aquosas de líquidos iónicos. Para além disso, deverá ser efetuado futuramente o estudo da solubilidade e extração dos triterpenos com soluções aquosas de líquidos iónicos mais baratos e benignos (como por exemplo, líquidos iónicos derivados de colinas e ácidos carboxílicos) de modo a diminuir os custos associados assim como a sua toxicidade (quer na perspectiva da adequação dos extratos a aplicações nutracêuticas, quer de modo a reduzir o seu impacto ambiental);
- ii. A otimização das condições operacionais de extração de modo a se obterem elevados rendimentos de extração de ácidos triterpénicos, assim como avaliar a recuperação dos solventes de forma a garantir a sustentabilidade de todo o processo para uma aplicação de larga escala. É também imprescindível desenvolver o método de isolamento e a purificação dos três ácidos triterpénicos assim como avaliar a sua atividade biológica utilizando soluções aquosas de LIs.
- iii. Uma valorização mais eficiente da casca externa de eucalipto recorrendo a um processo integrado de extração de ácidos triterpénicos e compostos fenólicos a partir da casca de *E. globulus*, utilizando em ambos os casos soluções aquosas de LIs.

6. Bibliografia

1. Domingues RMA, Sousa GDA, Freire CSR, Silvestre AJD, Neto C. Eucalyptus globulus biomass residues from pulping industry as a source of high value triterpenic compounds. *Ind Crops Prod.* 2010;31:65–70.
2. Domingues RMA, Patinha DJS, Sousa GDA, Villaverde JJ, Silva CM, Freire CSR, Silvestre AJD NC. Eucalyptus globulus biomass residues from pulping industry as a source of high value triterpenic compounds. *Cellul Chem Technol.* 2011;45:65–70.
3. Domingues RMA, Sousa GDA, Silva CM, Freire CSR, Silvestre, AJD NC. High value triterpenic compounds from the outer barks of several Eucalyptus species cultivated in Brazil and in Portugal. *Ind Crops Prod.* 2011;33:158–64.
4. Freire CSR, Silvestre AJD, Neto CP CJ. Lipophilic extractives of the inner and outer barks of Eucalyptus globulus. *Holzforschung.* 2002;56:372–9.
5. Domingues RMA, Melo MMR, Oliveira ELG, Neto CP, Silvestre AJD, Silva CM. Optimization of the supercritical fluid extraction of triterpenic acids from Eucalyptus globulus bark using experimental design. *J Supercrit Fluids.* 2013;74:105–14.
6. Gómez-Galera S, Pelacho AM, Gené A, Capel T CP. The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants. *Plant Cell Rep.* 2007;26:1689–715.
7. Wang G, Tang W BR. Terpenoides As Therapeutic Drugs and Pharmaceutical Agents. *Terpenoides As Therapeutic Drugs and Pharmaceutical Agents. Drug Disco.* 2005. p. 197–227.
8. Rates SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon.* 2001;39:603–13.
9. Sandun F AS, Chandrapal C MN. Biorefineries: Current Status, Challenges, and Future Direction. *Energy & Fuels.* 2006;20:1727–37.
10. Fitz PM, Champagne P, Cunningham FM WA. A biorefinery processing perspective: treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresour Technol.* 2010;101:8915–22.
11. Cherubini F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Convers Manag.* 2010;51:1412–21.
12. Clark JH, Luque R MA. Green chemistry, biofuels, and biorefinery. *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 2012;3:183–207.
13. Domingues RMA. Extraction and purification of triterpenic acids from eucalypt bark. Universidade de Aveiro; 2012.
14. Radich MC. Introdução e expansão do eucalipto em Portugal. *Pinhais e eucaliptais - A floresta Cultiv Colecção Árvores e Florestas Port.* 2007;4:151–65.

15. Uva JS. IFN6 – Áreas dos usos do solo e das espécies florestais de Portugal continental em 1995, 2005 e 2010. 2013 p. 1–34.
16. Goes A. eucalipto em Portugal Índice. 2014.
17. Mota I. Extração em base aquosa de compostos polares da casca de *Eucalyptus globulus* na perspectiva da sua recuperação. 2011;
18. Filho RB. Phitochemical contrution to development of emergent country. *Quim Nova*. 2010;33:229–39.
19. Croteau R, Kutchan Toni M, Lewis NG. Natural Products (Secondary Metabolites). In: Jones R, Buchanan B, Gruissem R, editor. *Natural products*. 2000. p. 1250–318.
20. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM MA, Sahena F, Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN OA. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng*. 2013;117:426–36.
21. Gutiérrez A, Del-Rio JC, González-Vila FJ MF. Chemical Composition of Lipophilic Extractives from *Eucalyptus globulus* Labill. *Wood. Holzforschung*. 1999;53:481–6.
22. Domingues RMA, Guerra AR, Duarte M, Freire CSR, Neto CP, Silva CMS SA. Bioactive Triterpenic Acids : From Agroforestry Biomass Residues to Promising Therapeutic Tools. *Mini Rev Org Chem*. 2014;11:382–99.
23. Muffler K, Leipold D SM, Haas C, Steingroewer J BT, Neuhaus HE, Mirata MA SU. Biotransformation of triterpenes. *Process Biochem*. 2011;46:1–15.
24. Paduch R, Kandefor-Szerszeń, Martyna, Trytek M FJ. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2007;55:315–27.
25. Laszczyk MN. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta Med*. 2009;75:1549–60.
26. Dzubak P, Hajduch M, Vydra D, Hustova A, Kvasnica M, Biedermann D, Markova L, Urban M SJ. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat Prod Rep*. 2006;23:394–411.
27. Fulda S KG. Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers. *Drug Discov Today*. 2009;14:885–90.
28. Liu J. Review article Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. 1995;49:57–68.
29. Pollier J GA. Oleanolic acid. *Phytochemistry*. 2012;77:10–5.

30. Fontanay S, Grare M, Mayer J, Finance C, Duval R. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: antibacterial spectra and selectivity indexes. *J Ethnopharmacol.* 2008;120:272–6.
31. Cichewicz RH KA. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and human immunodeficiency virus infection. *Med Res Rev.* 2004;24:90–114.
32. Silva GNS, Maria NRG, Schuck DC, Cruz LN, Moraes MS, Nakabashi M, Graebin C, Gosmann G, Garcia CRS GS. Two series of new semisynthetic triterpene derivatives: differences in anti-malarial activity, cytotoxicity and mechanism of action. *Malar J.* 2013;12:2–7.
33. Prades J, Vögler O, Alemany R, Gomez-Florit M, Funari SS, Ruiz-Gutiérrez V BF. Plant pentacyclic triterpenic acids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1808:752–60.
34. Shanmugam MK, Dai X, Kumar AP, Tan BKH, Sethi G, Bishayee A. Ursolic acid in cancer prevention and treatment: Molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies. *Biochem Pharmacol.* 2013;85:1579–87.
35. Yu M, Ocando JE TL, Chatterjee P. Molecular Interaction Studies of Amorphous Solid Dispersions of the Antimelanoma Agent Betulinic Acid. *AAPS PharmSciTech.* 2015;16:384–97.
36. Ebert SM, Dyle MC, Bullard SA, Dierdorff JM, Murry DJ, Fox DK, Bongers KS, Lira VA, Meyerholz DK, TalleyJJ AC. Identification and Small Molecule Inhibition of an ATF4-dependent Pathway to Age-related Skeletal Muscle Weakness and Atrophy. *J Biol Chem.* 2015;
37. Ácido ursólico. Available from: <http://www.acidoursolico.com/>
38. Liu J, Wang X, Liu R, Liu Y, Zhang T, Fu H HC. Oleanolic acid co-administration alleviates ethanol-induced hepatic injury via Nrf-2 and ethanol-metabolizing modulating in rats. *Chem Biol Interact.* Elsevier Ireland Ltd; 2014;221:88–98.
39. Sigma-Aldrich. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com>
40. Passos H, Freire MG, Coutinho JAP. Ionic liquid solutions as extractive solvents for value-added compounds from biomass. *Green Chem.* 2014;
41. Sánchez Avila N PCF, Luque de Castro MD. Ultrasound-assisted extraction and silylation prior to gas chromatography-mass spectrometry for the characterization of the triterpenic fraction in olive leaves. *J Chromatogr A.* 2007;1165:158–65.
42. Melo MMR, Oliveira ELG, Silvestre AJD SC. Supercritical fluid extraction of triterpenic acids from *Eucalyptus globulus* bark. *J Supercrit Fluids.* 2012;70:137–45.

43. Domingues RMA OE, Freire CSR CR, Simões PC, Neto CP, Silvestre AJD SC. Supercritical Fluid Extraction of *Eucalyptus globulus* Bark-A Promising Approach for Triterpenoid Production. *Int J Mol Sci.* 2012;13:7648–62.
44. Biczak R, Pawłowska B, Bałczewski P RP. The role of the anion in the toxicity of imidazolium ionic liquids. *J Hazard Mater.* 2014;274:181–90.
45. Martins MAR, Neves CMSS, Kurnia KA, Luís A, Santos LMNBF, Freire MG, Pinho SP CJ. Impact of the cation symmetry on the mutual solubilities between water and imidazolium-based ionic liquids. *Fluid Phase Equilib.* 2014;375:161–7.
46. Liu T, Sui X, Zhang R, Yang L, Zu Y, Zhang L, Zhang Y ZZ. Application of ionic liquids based microwave-assisted simultaneous extraction of carnosic acid, rosmarinic acid and essential oil from *Rosmarinus officinalis*. *J Chromatogr A.* 2011;1218:8480–9.
47. Freire MG, Santos LMNBF, Fernandes AM, Coutinho JAP, Marrucho IM. An overview of the mutual solubilities of water–imidazolium-based ionic liquids systems. *Fluid Phase Equilib.* 2007;261:449–54.
48. Ventura SPM, Gonçalves AMM, Gonçalves F CJ. Assessing the toxicity on [C3mim][Tf2N] to aquatic organisms of different trophic levels. *Aquat Toxicol.* 2010;96:290–7.
49. Bogdanov MG. Ionic Liquids as Alternative Solvents for Extraction of Natural Products. In: Chemat F, Vian MA, editors. Berlin, Heidelberg; 2014. p. 127–66.
50. Ventura SPM, Gonçalves AMM, Sintra T, Pereira JL, Gonçalves F CJ. Designing ionic liquids: the chemical structure role in the toxicity. *Ecotoxicology.* 2013;22:1–12.
51. Ressmann AK, Strassl K, Gaertner P, Zhao B, Greiner L, Bica K. New aspects for biomass processing with ionic liquids: towards the isolation of pharmaceutically active betulin. *Green Chem.* 2012;14:940.
52. Kilulyaa KF, Msagatib TAM, BB Mambab BB, Ngilab JC BT. Determination of lipophilic extractives in ionic liquid extracts of *Eucalyptus* pulp by gas chromatography-mass spectrometry. 2012;38.
53. Cláudio AFM, Ferreira AM, Freire MG CJ. Enhanced extraction of caffeine from guaraná seeds using aqueous solutions of ionic liquids. *Green Chem.* 2013;15:2002.
54. M Blesic, Marques MH, Plechkova, NV, Seddon KR RL, Lopes A. Self-aggregation of ionic liquids: micelle formation in aqueous solution. *Green Chem.* 2007;9:481.
55. Jungnickel C, Łuczak J RJ, Fernández JF, Müller A TJ. Micelle formation of imidazolium ionic liquids in aqueous solution. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2008;316:278–84.

56. Cláudio AFM, Neves MN, Shimizi K, Lopes JNC, Freire MG CJ. The magic of aqueous solutions of ionic liquids: Ionic liquids as a powerful class of cationic hydrotropes. *R Soc Chem.* 2013;1:1–15.
57. Inoue T, Ebina H, Dong Bi ZL. Electrical conductivity study on micelle formation of long-chain imidazolium ionic liquids in aqueous solution. *J Colloid Interface Sci.* 2007;314:236–41.
58. Vonc DB, Dolec V, Vonc E. Determination of Oleanolic , Betulinic and Ursolic Acid in Lamiaceae and Mass Spectral Fragmentation of Their Trimethylsilylated Derivatives. 2008;433–40.
59. Smirnova NA SE. Micellization in solutions of ionic liquids. *Colloid J.* 2012;74:254–65.
60. Bai G, Lopes A BM. Thermodynamics of micellization of alkylimidazolium surfactants in aqueous solution. *J Chem Thermodyn.* 2008;40:1509–16.
61. Łuczak J, Jungnickel C, Joskowska M, Thöming J, Hupka J. Thermodynamics of micellization of imidazolium ionic liquids in aqueous solutions. *J Colloid Interface Sci.* Elsevier Inc.; 2009;336:111–6.
62. El Seoud OA, Pires PAR, Abdel-Moghny T B EL. Synthesis and micellar properties of surface-active ionic liquids: 1-Alkyl-3-methylimidazolium chlorides. *J Colloid Interface Sci.* 2007;313:296–304.
63. Ao M, Kim D. Aggregation Behavior of Aqueous Solutions of 1 - Dodecyl-3-methylimidazolium Salts with Different Halide Anions. 2013;
64. Miskolczy Z, Sebök-Nagy K, Biczók L, Göktürk S. Aggregation and micelle formation of ionic liquids in aqueous solution. *Chem Phys Lett.* 2004;400:296–300.
65. Bowers J, Butts CP, Martin PJ, Vergara-Gutierrez MC, Heenan RK. Aggregation Behavior of Aqueous Solutions of Ionic Liquids. *Langmuir.* 2004;20:2191–8.
66. Chemspider, The free chemical database at: <http://www.chemspider.com>

7. Anexos

Anexo A - Caracterização dos ácidos triterpênicos da casca externa de *Eucalyptus Globulus*

Tabela 1 - Tempos de retenção e áreas dos picos correspondentes aos ácidos triterpênicos dos extratos da casca externa 1, por GC-MS.

Compostos da casca externa 1	Tempo de retenção / min	Área
Ácido betulônico		-
Ácido oleanólico	67,25	1488412865
Ácido betulínico	67,88	5354648181
Ácido ursólico	68,63	5717307186
Ácido 3-acetil oleanólico	69,33	5352722804
Ácido 3-acetil betulínico		-
Ácido 3-acetil ursólico	71,25	22060004946

Anexo A1 - Validação do método

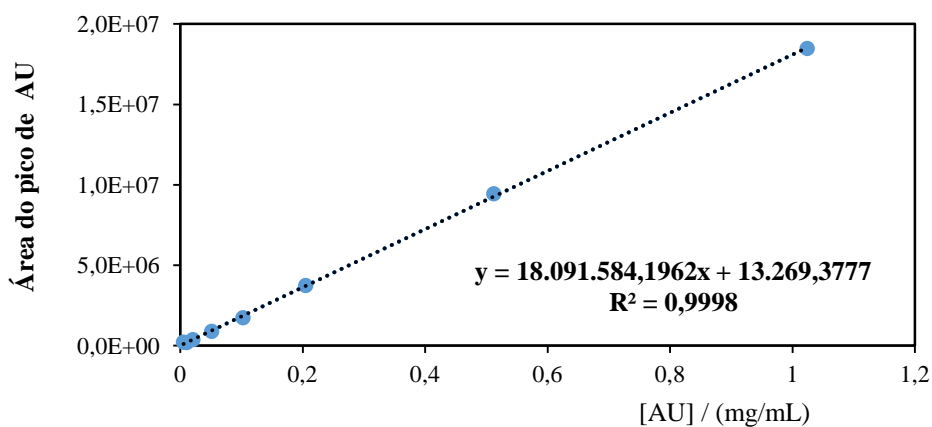


Figura 1: Curva de calibração para o ácido ursólico (área do sinal *versus* concentração).

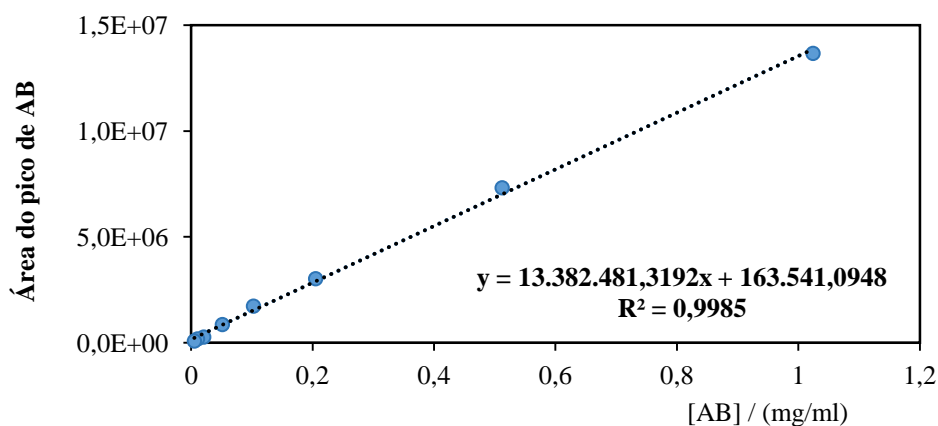


Figura 2: Curva de calibração para o ácido betulínico (área do sinal *versus* concentração).

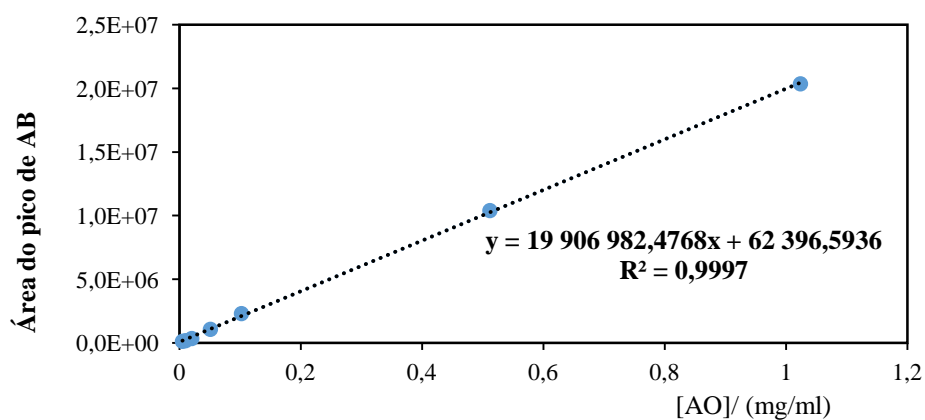
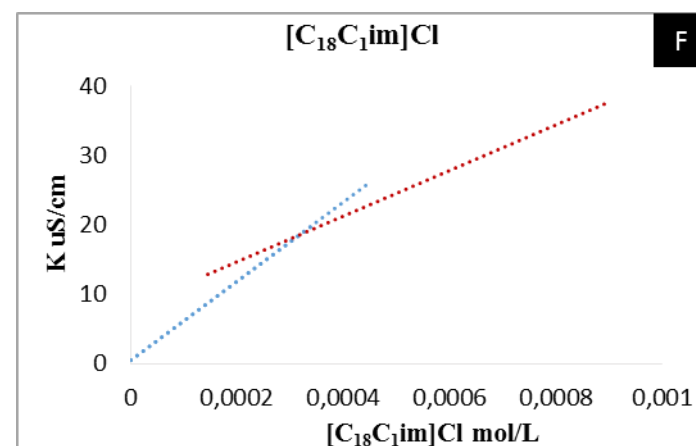
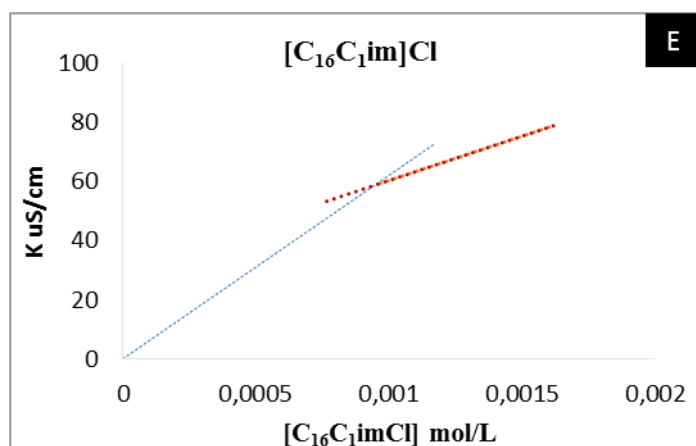
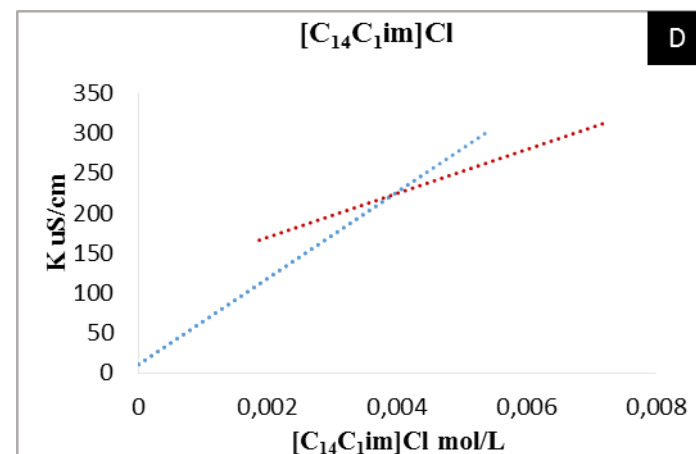
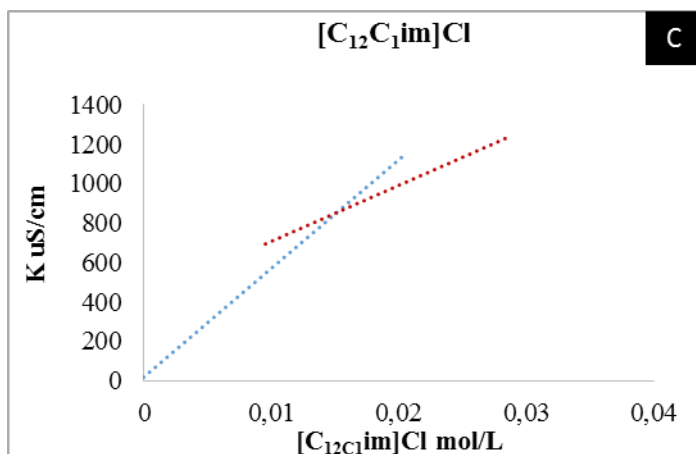
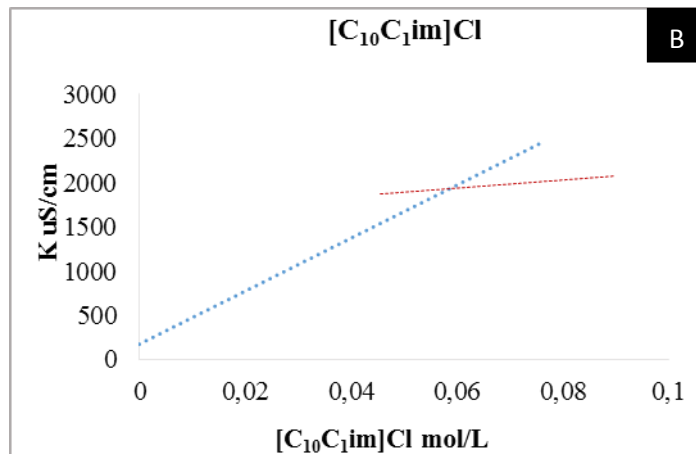
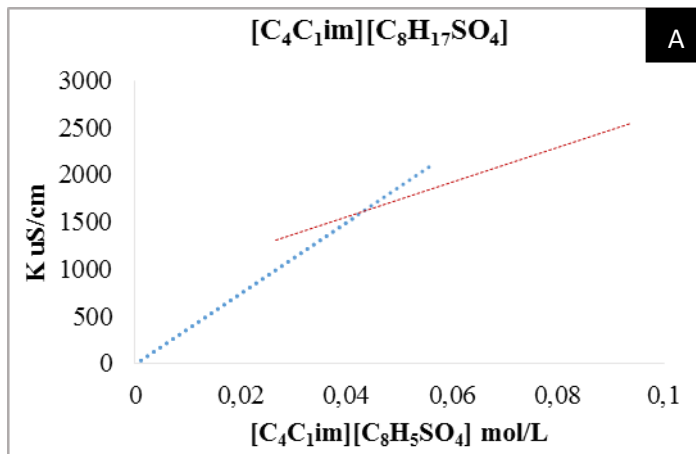


Figura 3: Curva de calibração para o ácido oleanólico (área do sinal *versus* concentração).sinal *versus* concentração

Anexo A3 - Condutividade *versus* concentração para as diferentes soluções aquosas de líquidos iônicos



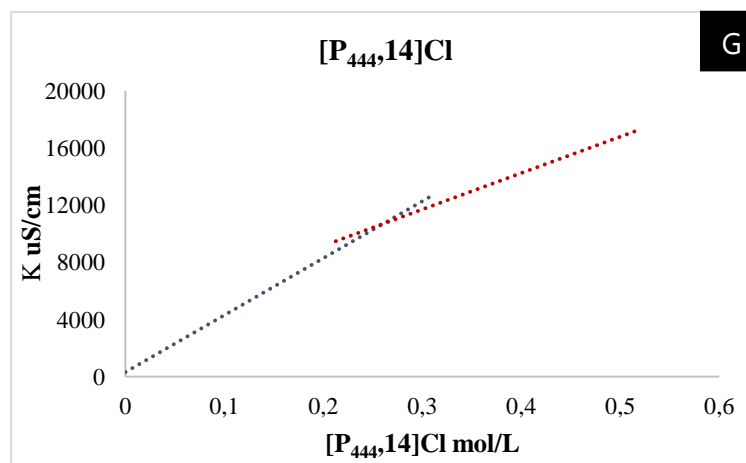


Figura 1: Condutividade específica (κ) em função da concentração de surfactante a 308,15 K: (A) $[\text{C}_4\text{C}_{1\text{im}}][\text{C}_8\text{H}_{17}\text{SO}_4]$; (B) $[\text{C}_{10}\text{C}_{1\text{im}}]\text{Cl}$; (C) $[\text{C}_{12}\text{C}_{1\text{im}}]\text{Cl}$; (D) $[\text{C}_{14}\text{C}_{1\text{im}}]\text{Cl}$ ($C = 0,02 \text{ M}$); (E) $[\text{C}_{16}\text{C}_{1\text{im}}]\text{Cl}$ (F) $[\text{C}_{18}\text{C}_{1\text{im}}]\text{Cl}$ e (G) $[\text{P}_{444,14}]\text{Cl}$