



**Universidade de
Aveiro**

2015/2016

Departamento de Química

**Rafael Santos do
Carmo**

**Extração de cinaropicrina a partir do cardo
cultivado utilizando solventes eutécticos profundos**

**Cynaropicrin extraction from cultivated cardoon
using deep eutectic solvents**



Universidade de
Aveiro

2015/2016

Departamento de Química

**Rafael Santos do
Carmo**

**Extração de cinaropicrina a partir do cardo cultivado
utilizando solventes eutéticos profundos**

**Cynaropicrin extraction from cultivated cardoon
using deep eutectic solvents**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, ramo de Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor Armando Jorge Domingues Silvestre, Professor Associado com Agregação da Universidade de Aveiro, e co-orientação da Doutora Mara Guadalupe Freire Martins, Investigadora Coordenadora do Departamento de Química, CICECO, da Universidade de Aveiro

O júri

presidente

Prof. Dr. João Manuel da Costa e Araújo Pereira Coutinho
Professor Catedrático, Universidade de Aveiro

Prof. Dr. Armando Jorge Domingues Silvestre
Professor Associado com Agregação, Universidade de Aveiro

Dr^a. Maria Olga de Amorim e Sá Ferreira
Professora Adjunta, Instituto Politécnico de Bragança

Agradecimentos

Inicialmente, gostaria de agradecer aos meus orientadores, o Professor Armando Silvestre e a Doutora Mara Freire, pelo excelente acompanhamento e por toda a força nesta caminhada. Os seus conhecimentos e o apoio incansável foram fundamentais.

Um agradecimento a todos os membros do Path, por me proporcionarem um excelente ambiente de trabalho e por estarem sempre disponíveis para ajudar em tudo. Obrigado, em especial a ti, Ana Filipa Cláudio, pela constante força, por acreditares sempre nas minhas capacidades e por me contagiares com o teu otimismo. Serás sempre um exemplo para mim. E obrigado a ti, Manu, caí de pára-quebras nas tuas mãos, mas mostraste a excelente profissional e pessoa que és, dando tudo de ti e sendo um apoio incrível, obrigado!

Aveiro, a cidade que ficará para sempre no meu coração! Deixo as recordações e levo os amigos comigo. Catarina, a melhor coisa que o vento de Aveiro me deu. Calixto, o verdadeiro companheiro e o incrível apoio desta grande aventura. Daniel, a pessoa fantástica que nunca me deixou desistir de nada. Marta, uma força da natureza e um grande exemplo para mim. Liliana, uma companheira para vida! Obrigado!

Joana, Cátia, Tita e Sara, Obrigado! Obrigado por terem confiado em mim e por fazerem de mim uma pessoa melhor todos os dias!

E porque Aveiro me encheu de experiências únicas, que me trouxeram verdadeiros companheiros, André, Martins, Simão, Andrade, Pancho, Sara, Bornes, Bruno, Henrique, Mariana, Afonso, Obrigado!

Um agradecimento muito especial às duas pessoas que lutaram todos os dias para que conseguisse realizar este sonho, que sei que é nosso, Pai e Mãe. A educação excepcional e a vossa paciência comigo, tornaram tudo isto possível. Obrigado! E um agradecimento muito especial a ti, Wilson. És um verdadeiro guerreiro, e vejo em ti um grande exemplo! O irmão que a vida me deu e que jamais me vai tirar! Obrigado por tudo!

Quando uma jornada termina, abraçamos a próxima com um novo foco e uma motivação renovada! Assim, com a experiência incrível que a Universidade de Aveiro me proporcionou, sei que abraçarei a próxima jornada com toda a força, porque terei ao meu lado todos vocês! Obrigado!

Palavras-chave

Cynara carunculus, extração sólido-líquido, compostos bioativos, cinaropicrina, solventes eutéticos profundos.

Resumo

O objetivo principal do presente trabalho foi estudar a aplicação de solventes eutéticos profundos (DES) na extração de cinaropicrina, um composto lipofílico de elevado valor comercial e com várias propriedades farmacêuticas, a partir das folhas do cardo. Este trabalho foi dividido em duas partes principais: preparação e caracterização de DES e extração e quantificação da cinaropicrina.

Os DES utilizados foram preparados a partir de misturas de sais de amônio e ácidos carboxílicos. De modo a avaliar e caracterizar os DES a utilizar no processo de extração, primeiramente determinaram-se os parâmetros solvatocrômicos, densidade e viscosidade dos mesmos. Posteriormente foram selecionados os DES com as propriedades mais promissoras, e os resultados obtidos no processo de extração demonstraram a elevada seletividade e eficiência destes solventes para a extração de cinaropicrina a partir de folhas do cardo. Estudaram-se também soluções aquosas de DES, o que permitiu obter uma eficiência máxima de extração de 6,2 (m/m) % de cinaropicrina. A sustentabilidade do processo de extração foi finalmente otimizada pela realização de vários ciclos de extração, reutilizando quer a biomassa quer as soluções aquosas de DES. Este estudo permitiu obter eficiências máximas de extração de 8,96 (m/m) % de cinaropicrina reutilizando a biomassa, e de 7,45 (m/m) % reutilizando o solvente. Após a extração de cinaropicrina, e tirando partido dos limites de solubilidade de cinaropicrina em solução aquosa em função da concentração de DES, adicionou-se água como anti-solvente resultando numa percentagem de recuperação máxima de cinaropicrina de 73,6 (m/m) %. Em resumo, esta dissertação demonstra o potencial de DES na extração de compostos bioativos a partir de fontes naturais. No entanto a complexidade do resíduo sólido obtido deste processo deixa em aberto uma série de desafios para a continuidade deste estudo, com vista à valorização da folha do cardo.

Keywords

Cynara carunculus, solid-liquid extraction, bioactive compounds, cynaropicrin, deep eutectic solvents.

Abstract

The main objective of this work was to study the application of deep eutectic solvents (DES) in the extraction of cynaropicrin, a lipophilic compound of high commercial value and with various pharmaceutical properties, from cardoon leaves. This work was divided into two main parts: preparation and characterization of DES and extraction and quantification of cynaropicrin.

The DES used were prepared from mixtures of ammonium salts and carboxylic acids. In order to evaluate and characterize the DES to use in the extraction process, their solvatochromic parameters, density and viscosity were firstly determined. After selecting the most promising DES according to their properties, the results obtained in the extraction process demonstrated the high selectivity and efficiency of these solvents to extract cynaropicrin from cardoon leaves. Aqueous solutions of DES were also studied, which allowed to obtain a maximum extraction efficiency of 6.20 (w/w) % of cynaropicrin. The sustainability of the extraction process was finally optimized by carrying out several extraction cycles, reusing either the biomass or the aqueous solutions of DES. This study yielded a maximum extraction efficiency of 8.96 (w/w) % of cynaropicrin reusing the biomass, and of 7.45 (w/w) % reusing the solvent. After the cynaropicrin extraction, and taking advantage of the cynaropicrin's solubility limits in aqueous solutions according to the DES concentration, water was added as an anti-solvent resulting in the recovery of 73.6 (w/w) % of cynaropicrin. In summary, this work demonstrates the potential of DES in the extraction of bioactive compounds from natural sources. However, considering the complexity of the solid residue obtained a number of challenges will remain open aiming at the valorization of cardoon leaves.

Índice

1.	Introdução	1
1.1.	Contextualização	3
1.2.	<i>Cynara cardunculus</i> L.....	5
1.2.1.	Distribuição geográfica	6
1.2.2.	Importância económica	6
1.2.3.	Composição química	8
1.3.	Extração de compostos bioativos	15
1.3.1.	Métodos alternativos de extração de compostos bioativos.....	18
1.4.	Objetivos	27
2.	Materiais e Métodos	29
2.1.	Reagentes	31
2.2.	Preparação dos DES.....	33
2.2.1.	Densidade e viscosidade de DES puros	35
2.2.2.	Parâmetros solvatocrómicos.....	35
2.3.	Extração da Cinaropicrina a partir das folhas do cardo.....	36
2.3.1.	Extração por Soxhlet	36
2.3.2.	Extração com DES e solventes orgânicos	36
2.3.3.	Otimização do processo de extração	37
2.3.4.	Caracterização do extrato em diclorometano de <i>C. cardunculus</i> L. por GC-MS....	38
2.3.5.	Quantificação da cinaropicrina por HPLC-DAD	39
3.	Resultados e Discussão	41
3.1.	Formação dos DES.....	43
3.1.1.	Densidade e viscosidade dos DES puros.....	43
3.1.2.	Parâmetros Solvatocrómicos	46
3.3.	Extração da cinaropicrina a partir das folhas do cardo.....	48
3.3.1.	Caracterização do extrato lipofílico de <i>C. cardunculus</i> L. por GC-MS	48
3.3.2.	Caracterização do extrato lipofílico de <i>C. cardunculus</i> L. por HPLC-DAD.....	49
3.3.3.	Extração da cinaropicrina com DES	49
3.3.3.1.	Otimização das condições de extração da cinaropicrina com DES.....	52
3.3.3.2.	Reutilização dos solventes e biomassa.....	56
3.3.1.3.	Recuperação da cinaropicrina a partir das soluções aquosas de DES	57
4.	Conclusão e Trabalho futuro	61
5.	Bibliografia	65

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Composição química do cardo cultivado (% m/m). Adaptado de (30).	8
Tabela 2 - Rendimentos das frações lipofílicas das várias partes morfológicas de <i>Cynara cardunculus</i> . L. var. <i>altilis</i> DC (35).	10
Tabela 3 – Métodos de extração de cinaropicrina a partir de várias matérias-primas....	17
Tabela 4 - Exemplos de extrações de compostos bioativos a partir de diferentes espécies vegetais com recurso a DES.	24
Tabela 5 - Parâmetros solvatocrômicos Kamlet-Taft de vários solventes, utilizando o corante de Reichard, 4-nitroanilina e N,N-dimetill-4-nitroanilina (110).	25
Tabela 6 - Reagentes utilizados neste trabalho (Reagente; Pureza; Fornecedor e Estrutura)	31
Tabela 7 - Combinações de HBD:HBA testadas na formação de DES.....	33
Tabela 8 - Preparação das soluções padrão.	39
Tabela 9 - Parâmetros solvatocrômicos Kamlet-Taft de alguns DES utilizados neste trabalho determinados a 25 °C.....	46
Tabela 10 - Parâmetros solvatocrômicos Kamlet-Taft dos ácidos carboxílicos e água utilizados nas várias formulações dos DES determinados a 25 °C. Valor de (a) adaptado de (110).....	47
Tabela 11 - Concentração de cinaropicrina em mg por mL na solução aquosa de DES e cinaropicrina precipitada ((m/m) %) após a adição de diferentes volumes de água (5, 10, 15, 25 e 50 mL).	58

Índice de Figuras

Figura 1 - Origem dos medicamentos aprovados entre 1981 e 2006 pela FDA. Adaptado de (3).	3
Figura 2 – Estrutura química do paclitaxel.	5
Figura 3 - Ilustração das plantas pertencentes às três variedades de <i>C. cardunculus</i> L.: A- alcachofra; B-cardo cultivado; C-cardo selvagem. Adaptado de (11).	5
Figura 4 - Vias para a produção de três grandes grupos de compostos bioativos nas plantas. Ciclo TCA define o ciclo do ácido tricarboxílico. Adaptado de (6).	9
Figura 5 - Principais triterpenos pentacíclicos presentes no cardo: i) Taraxastano; ii) Oleanano; iii) Lupano; iv) Ursano.	10
Figura 6 – Principais estruturas químicas das lactonas sesquiterpénicas mais comuns.	11
Figura 7 – Principais famílias de compostos lipofílicos presentes nas diferentes partes morfológicas de <i>C. cardunculus</i> L. var. <i>altilis</i> (DC) (mg de composto / kg de peso seco). Adaptado de (35).	12
Figura 8 - Estrutura química da cinaropicrina.	12
Figura 9 - Exemplos de compostos fenólicos presentes no cardo [1 e 2-ácidos hidroxicinâmicos (ácido 4-O-cafeoilquínico; ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico); 3-flavonóide (eriodictiol hexosíde); 4-cumarina (escopolina)].	14
Figura 10 - Composição fenólica dos extratos de metanol / água / ácido acético (49,5:49,5:1) a partir de várias partes morfológicas de <i>C. cardunculus</i> L. var. <i>altilis</i> (DC) (C-cumaridas; F- flavonóides e HA-ácidos hidroxicinâmicos). Adaptado de (53).	15
Figura 11 - Esquema geral de partição e separação dos principais metabolitos secundários presentes nas plantas (64,66) e representação esquemática da extração por Soxhlet.	17
Figura 12 - Formação de um DES (mistura de ureia e cloreto de colina). Adaptado de (85).	20
Figura 13– Diagrama de fases de uma mistura eutéctica com dois componentes. Adaptado de (84).	20
Figura 14 - Estruturas de HBD e HBA que podem ser combinados para formar (NA)DES. Adaptado de (82).	21
Figura 15 - Placa de aquecimento com agitação utilizada nas extrações com DES.	36
Figura 16 - Curva de calibração para a cinaropicrina.	40
Figura 17 - Densidade dos DES obtidos em função da temperatura numa razão molar de 2:1, utilizando como HBA [N ₄₄₄₄]Br e como HBD diferentes ácidos carboxílicos.	44
Figura 18 - Densidade dos DES obtidos em função da temperatura numa razão molar de 2:1, utilizando como HBA [N ₄₄₄₄]Br e como HBD diferentes ácidos carboxílicos.	44
Figura 19 - Viscosidade dos DES obtidos em função da temperatura numa razão molar de 2:1, utilizando como HBA [N ₄₄₄₄]Br e como HBD diferentes ácidos carboxílicos.	45
Figura 20 - Viscosidade dos DES obtidos em função da temperatura numa razão molar de 2:1, utilizando como HBA [N ₄₄₄₄]Br e como HBD diferentes ácidos carboxílicos.	45
Figura 21 - Cromatograma de GC-MS do extrato em diclorometano das folhas de <i>C.</i> <i>cardunculus</i>	48
Figura 22 - Cromatograma de HPLC-DAD do extrato resultante da extração por soxhlet com diclorometano das folhas do cardo.	49
Figura 23 - Rendimentos de extração de cinaropicrina com vários DES, nas seguintes condições de extração: R _{S/L} de 1:10; 2 horas e 25 °C.	50
Figura 24 - Rendimentos de extração de cinaropicrina com DES (Ácidos carboxílicos: [N ₄₄₄₄]Cl) e com os HBD destes solventes, nas seguintes condições de extração: R _{S/L} de 1:10; 2 horas e 25 °C.	51
Figura 25 - Rendimentos de extração de cinaropicrina com DES e com solventes orgânicos e água pura nas seguintes condições de extração: R _{S/L} de 1:10; 2 horas e 25 °C.	51

Figura 26 - Rendimentos de extração da cinaropicrina com ácido decanóico:[N ₄₄₄₄]Cl, na proporção molar 2:1, variando a temperatura (25 °C, 35 °C e 45 °C).	52
Figura 27 - Rendimentos de extração da cinaropicrina a partir do cardo com DES (ácido decanóico:[N ₄₄₄₄]Cl, na proporção molar 2:1), variando o tempo de extração (30 min, 40 min, 50 min, 1 h, 2 h, 5 h e 24 h).....	53
Figura 28 - Rendimentos de extração da cinaropicrina a partir do cardo com DES (ácido decanóico: [N ₄₄₄₄]Cl, na proporção molar 2:1), variando a razão sólido-líquido (1:10; 1:20; 1:30; 1:40 e 1:50).	54
Figura 29 - Rendimentos de extração da cinaropicrina a partir do cardo com DES (ácido decanóico: [N ₄₄₄₄]Cl, na proporção molar 2:1), na R _{S/L} de 1:30, variando a percentagem de água adicionada ao DES (entre 0 e 100 %)	55
Figura 30 - Rendimentos de extração da cinaropicrina a partir do cardo com soluções aquosas de DES (ácido decanóico:[N ₄₄₄₄]Cl, na proporção molar 2:1, com 70 % de água), realizando 6 ciclos de extração sucessivos, com reutilização da biomassa.	56
Figura 31 - Rendimentos de extração da cinaropicrina a partir do cardo com soluções aquosas de DES (ácido decanóico:[N ₄₄₄₄]Cl, na proporção molar 2:1, com 70 % de água), realizando 4 ciclos de extração sucessivos, com reutilização do solvente.....	57
Figura 32 - Precipitado obtido após adição de água e Cromatograma de HPLC-DAD do precipitado obtido após dissolução em metanol.....	58

Lista de Abreviaturas

[N₂₂₂₂]Cl – Cloreto de tetraetilamônio;

[N₃₃₃₃]Cl - Cloreto de tetrapropilamônio;

[N₄₄₄₄]Cl - Cloreto de tetrabutilamônio;

[N₂₂₂₂]Br - Brometo de tetraetilamônio;

[N₃₃₃₃]Br - Brometo de tetrametilamônio;

[N₄₄₄₄]Br - Brometo de tetrabutilamônio;

HBA - Aceitador de prótons, *hydrogen bond acceptor*;

CI - Cinaropicrina

BSTFA - *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida;

HBD – Dador de prótons, *hydrogen bond donor*;

FDA - *Food and Drug Administration*

GC-MS - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, *Gas chromatography-mass spectrometry*;

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência, *High-Performance Liquid Chromatography*;

HPLC- DAD - Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor *diode array*, *High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection*;

HPTLC - Cromatografia líquida de alta eficiência em camada fina, *High performance thin layer chromatography*;

STLs – Lactonas Sesquiterpénicas, *sesquiterpene lactones*;

RMN - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear, *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*;

R_{S/L} – Razão sólido-líquido;

scCO₂ - Dióxido de Carbono supercrítico;

DES - Solventes eutécticos profundos, *Deep eutectic solvents*;

TMSCI – trimetilclorossilano;

TMS – trimetilsilano.

1. Introdução

1.1. Contextualização

Os produtos de origem natural, em particular derivados de plantas, são uma fonte essencial de novos compostos bioativos com potencial nutracêutico. Contudo, algumas fontes (1) estimam que cerca de 95 % da biodiversidade mundial não foi avaliada ainda para qualquer atividade biológica. Assim, desenvolver formas eficientes de estudar e utilizar essa biodiversidade pela sua valorização adequada é um grande desafio atual para a comunidade científica (2).

A utilização de plantas medicinais remonta ao início da história da humanidade. No século XIX, em 1804, o isolamento da morfina a partir de *Papaver somnifera* impulsionou o interesse da indústria farmacêutica para a utilização de produtos naturais como medicamentos (1). Dos 1184 novos medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) entre 1981 e 2006, 50 % têm origem em produtos naturais - Figura 1 (3). Um exemplo destes é o fármaco amplamente utilizado no tratamento do cancro da mama, o *paclitaxel* (Figura 2), que é isolado a partir de *Taxus brevifolia*, o teixo do Pacífico (1).

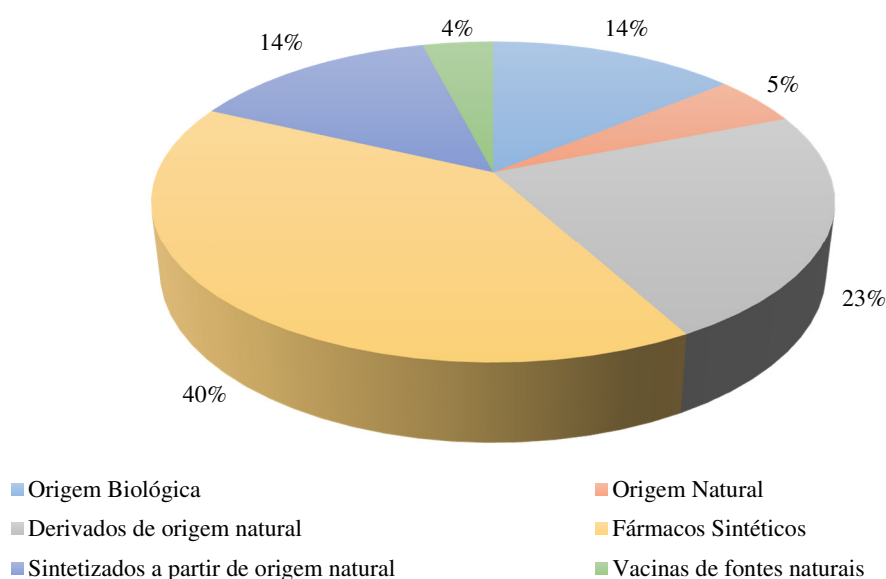


Figura 1 - Origem dos medicamentos aprovados entre 1981 e 2006 pela FDA. Adaptado de (3).

Por outro lado, nos últimos anos, a utilização de nutracêuticos e suplementos alimentares provenientes de plantas aumentou consideravelmente, como uma abordagem complementar ao tratamento realizado com medicamentos sintéticos. Recorrendo a fármacos de origem natural é frequentemente possível um tratamento menos agressivo de várias doenças crónicas, nomeadamente cardiovasculares, cancro, diabetes e patologias

do sistema nervoso (4). A eficácia e segurança dos produtos provenientes de plantas têm aumentado com o crescente conhecimento científico da composição química destas e dos efeitos fisiológicos dos compostos isolados (5). O uso industrial de fitofármacos nos países ocidentais e plantas tradicionais nos países em desenvolvimento é uma realidade e a sua expansão é significativa nos anos mais recentes (1). No entanto, o isolamento e elucidação da estrutura dos compostos químicos naturais tornam-se requisitos essenciais para que possam ser utilizados como medicamentos e/ou suplementos, quer para uso humano quer animal (2).

É igualmente fundamental o desenvolvimento e aplicação de métodos de extração e/ou purificação que permitam uma elevada seletividade e eficiência de extração para os compostos bioativos em causa e que sejam simultaneamente compatíveis com a utilização final, sustentáveis e não nocivos para o ambiente. De forma a responder a estes desafios, nas últimas décadas desenvolveram-se novos métodos de extração e/ou aplicando solventes mais benignos (6), nomeadamente extração assistida por micro-ondas e por enzimas, e com recurso a solventes alternativos, como os fluídos supercríticos (6,7), com o intuito de desenvolver técnicas de extração mais sustentáveis e de substituir os solventes orgânicos tóxicos e voláteis normalmente utilizados para o efeito. Estes métodos revelaram aumentar a seletividade para o composto alvo, facilitaram a sua separação dos extratos e aumentaram a segurança de utilização dos mesmos. Assim, estes métodos mais recentes de extração apresentam-se como alternativas promissoras para a extração de compostos bioativos, a partir das mais diversas fontes naturais, como por exemplo o cardo utilizado neste trabalho.

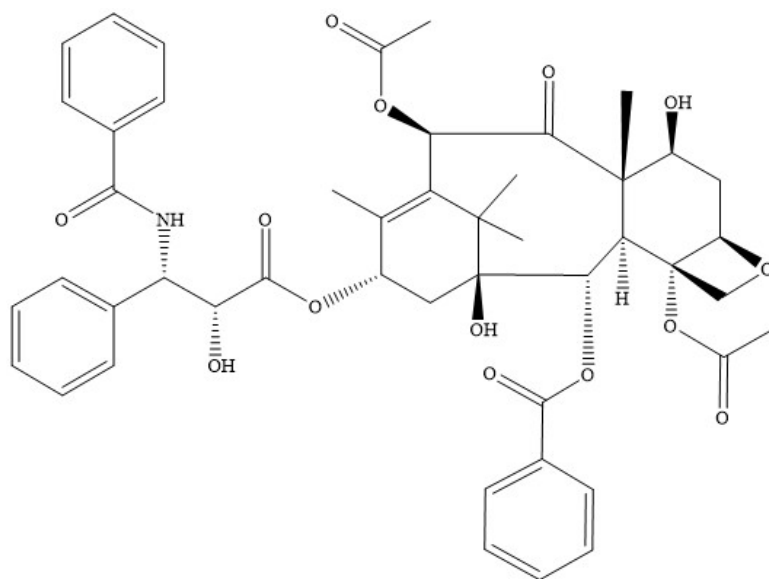


Figura 2 – Estrutura química do *paclitaxel*.

1.2. *Cynara cardunculus* L.

O cardo selvagem (*Cynara cardunculus* var. *sylvestris* L.) é o antepassado das formas cultivadas, nomeadamente da alcachofra (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) e do cardo cultivado (*Cynara cardunculus* var. *altilis* DC.), que evoluíram separadamente como resultado dos diferentes critérios de seleção (8,9). Ambas as espécies são da família botânica *Asteraceae*, nativa da bacia do Mediterrâneo (10).



Figura 3 - Ilustração das plantas pertencentes às três variedades de *C. cardunculus* L.: A-alcachofra; B-cardo cultivado; C-cardo selvagem. Adaptado de (11).

As variedades de *C. cardunculus* L. cultivado não apresentam espinhos nos seus caules, folhas e capítulos florais (Figura 3A e 3B), ao contrário do cardo selvagem (Figura 3C). A alcachofra, como planta doméstica (Figura 3A), exibe inflorescências imaturas e brácteas entalhadas. O cardo cultivado (Figura 3B), desenvolvido para o alargamento da nervura da folha, apresenta capítulos globosos azul-violeta. Por outro lado, o cardo selvagem (Figura 3C) apresenta uma roseta característica de grandes folhas e caules ramificados, com capítulos com espinhos longos (12).

1.2.1. Distribuição geográfica

O cardo selvagem encontra-se ao longo do oeste e parte central da bacia do Mediterrâneo, desde Portugal ao oeste da Turquia, existindo também nas ilhas da Madeira e Canárias. Esta é também uma espécie colonizadora na Argentina e Califórnia (12). A alcachofra, planta herbácea perene, apresenta-se como um produto importante na economia agrícola do sul da Europa e do norte de África. Esta planta encontra-se também na Califórnia, América do Sul (essencialmente Peru e Argentina) e na China (13). O cardo cultivado, igualmente uma planta herbácea perene, cresce naturalmente em regiões áridas com temperaturas altas, e regiões com salinidade elevada e seca no verão (14,15). Esta planta encontra-se na Europa, Norte de África, Ilhas da Madeira e Canárias e América do Sul. Na Península Ibérica é encontrada, principalmente no sul de Portugal e de Espanha (12). Além do cardo apresentar uma reprodução vegetativa, com uma produtividade de biomassa que varia entre 15,2 a 24,2 ton / ha / ano (16), esta planta produz anualmente cerca de 600 a 30.000 sementes que são dispersas pelo vento (17).

1.2.2. Importância económica

A *C. cardunculus* L. é utilizada por todo o mundo e representa um ingrediente importante da dieta mediterrânica, apresentando uma variedade de aplicações, desde a sopa até às saladas (14). As flores do cardo e da alcachofra são, tradicionalmente, utilizadas em algumas regiões de Espanha e de Portugal como coagulante natural do leite para a fabricação de queijos de ovinos e caprinos. Estas flores são ricas em protéases aspárticas, nomeadamente cardosinas, responsáveis pela coagulação do leite (18). O queijo de ovelha produzido através do coalho desta planta é, atualmente, altamente

valorizado devido às suas propriedades organolépticas (19,20). Enquanto os capítulos da alcachofra são consumidos em todo o mundo como vegetais, nas formas fresco, congelado ou enlatado, o extrato das folhas da alcachofra é muito utilizado na produção do licor amargo *Cynar* (21).

Tradicionalmente, as folhas da alcachofra são utilizadas na prática medicinal, apresentando características terapêuticas, como o efeito diurético, colerético, antidiabético e como agente antimicrobiano (22,23). Além disso, os extratos das folhas e sementes da alcachofra, devido ao seu elevado teor em cinarina, inulina e ésteres fenólicos, respetivamente, são utilizados no tratamento de hiperlipidemia, arteriosclerose, entre outros (21).

O crescente interesse na exploração do cardo cultivado, como fonte de biomassa no sul de Portugal e a procura de novos componentes de plantas bioativas, estimulou o estudo das diferentes partes morfológicas desta planta. Por outro lado, existem aplicações industriais propostas para esta planta, como a sua utilização como biocombustível sólido, no aquecimento ou produção de energia (24). Os biocombustíveis líquidos, como o biodiesel, podem também ser produzidos a partir do óleo das sementes do cardo, que apresentam um teor máximo de óleo de 32,5 % (25). De facto, nos últimos anos, o estudo da produção de biodiesel a partir do óleo das sementes do cardo tem estado em foco, sendo uma potencial alternativa aos recursos fósseis na Europa (25,26). Por outro lado, a semelhança das propriedades das fibras celulósicas obtidas a partir do cardo e de eucalipto, torna esta espécie uma alternativa interessante na produção de pasta de papel (17,27).

A extração de alguns compostos farmacologicamente ativos de *Cynara cardunculus* apresenta-se também como uma aplicação promissora desta biomassa vegetal. A sua composição rica em extratáveis bioativos fez com que sejam já utilizados em suplementos dietéticos comerciais para tratamento de problemas digestivos, entre outros (28). Por outro lado, os metabolitos secundários podem ser considerados produtos de química fina, uma vez que os compostos biologicamente ativos usados comercialmente (fármacos, aromas, fragâncias, pesticidas) sofrem transformação química para produzir produtos de valor acrescentado (29).

1.2.3. Composição química

A composição química geral do cardo cultivado (Tabela 1) apresenta um teor superior a 50 % de polissacarídeos, entre os quais a celulose (um homopolissacarídeo constituído por unidades de glucose) é o maioritário (30). As hemiceluloses compreendem diferentes heteropolissacarídeos com um peso molecular inferior ao apresentado pela celulose. Apesar da presença de mananas e galactanas, as xilanas são as hemiceluloses mais abundantes no cardo (30,31), sendo essenciais na resistência mecânica das paredes celulares secundárias das plantas (32). A lenhina é um polímero fenólico amorfo (33), presente no cardo entre 20 a 30 % da biomassa total, um valor inferior ao normalmente encontrado em plantas arbóreas (34).

Tabela 1 - Composição química do cardo cultivado (% m/m). Adaptado de (30).

Componente	(% m/m)
Extractáveis em acetona	1,4 ± 0,1
Pectinas	14,4 ± 0,8
Proteínas	7,0 ± 0,2
Taninos	3,0 ± 0,0
Lenhina	14,9 ± 0,1
Celulose	41,9 ± 0,0
Hemicelulose	12,8 ± 0,7
Cinzas	4,6 ± 1,4

Os compostos bioativos extraídos a partir de biomassa são na sua maioria metabolitos secundários. Estes metabolitos encontram-se normalmente restritos a um determinado grupo taxonómico (espécie, género, família, ou grupo restrito de famílias) (29). As várias famílias dos metabolitos secundários apresentam características estruturais particulares resultantes da sua via biossintética. As quatro principais vias de biossintese dos metabolitos secundários são: 1) a via do ácido chiquímico, responsável pela produção de alcaloides, como a quinina, a partir de aminoácidos aromáticos; 2) a via do ácido malónico, que em conjunto com a via do ácido chiquímico, dá origem aos compostos fenólicos, como o ácido gálico; 3) a via do ácido mevalónico; e 4) a via não-mevalonato (Via MEP). As duas últimas vias são responsáveis pela produção de terpenos, como a cinaropicrina (Figura 4) (6).

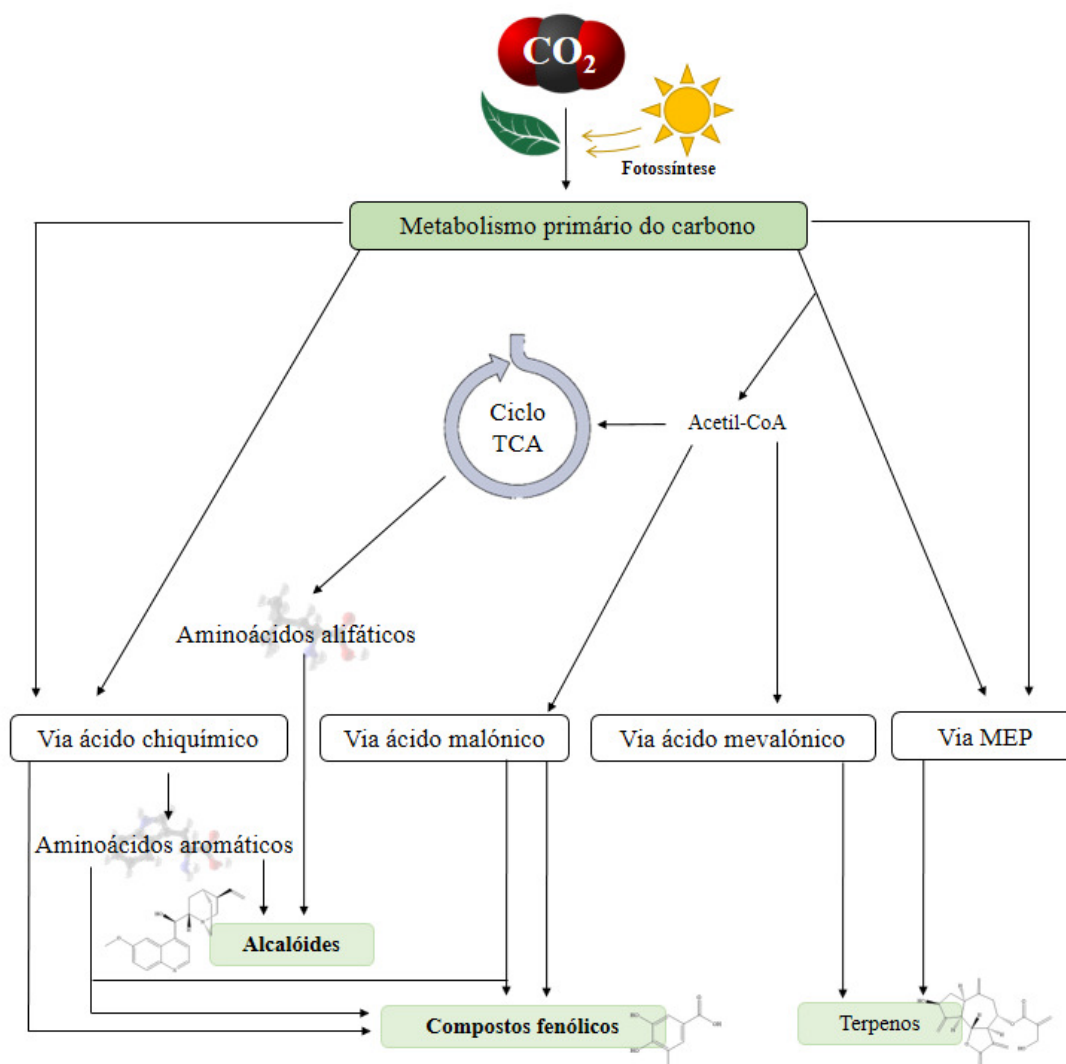


Figura 4 - Vias para a produção de três grandes grupos de compostos bioativos nas plantas. Ciclo TCA define o ciclo do ácido tricarboxílico. Adaptado de (6).

O isolamento dos metabolitos secundários a partir de plantas, e em particular a partir do cardo para fins meramente analíticos, recorre frequentemente a processos de extração convencional sólido-líquido, utilizando solventes orgânicos de diferentes polaridades, o que resulta na obtenção de extratos compostos por famílias específicas de compostos, de acordo com a sua polaridade, como a seguir será descrito.

A composição das frações lipofílicas nas diferentes partes morfológicas de *Cynara cardunculus* L. é semelhante do ponto de vista qualitativo, mas consideravelmente diferente do ponto de vista quantitativo. As folhas são a parte da planta que apresenta um maior teor em compostos lipofílicos (Tabela 2) e, portanto, a parte da planta que será explorada nesta tese. No cardo cultivado, as lactonas sesquiterpênicas e os triterpenos pentacíclicos são as principais famílias de compostos lipofílicos. Enquanto os triterpenos

pentacíclicos, nomeadamente os taraxastanos, ursanos, lupanos e oleananos (Figura 5), representam a maior família de compostos lipofílicos de todas as partes morfológicas do cardo cultivado, com a exceção das folhas, as lactonas sesquiterpénicas encontram-se concentradas essencialmente nas folhas. Por outro lado, os ácidos gordos, esteróis, álcoois alifáticos de cadeia longa e alguns compostos aromáticos encontram-se presentes em concentrações menores (35).

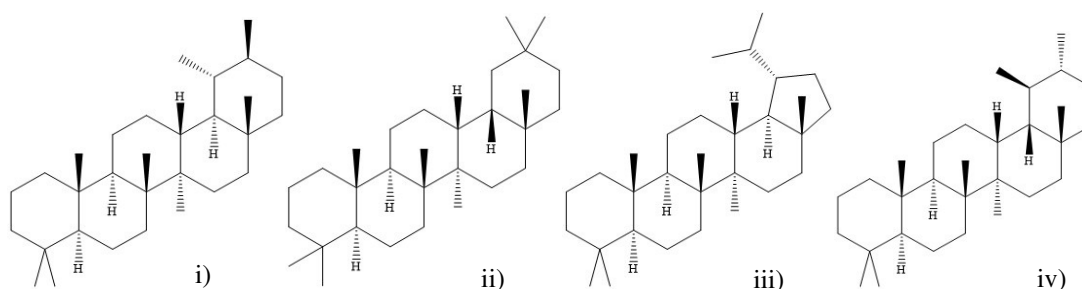


Figura 5 - Principais triterpenos pentacíclicos presentes no cardo: i) Taraxastano; ii) Oleanano; iii) Lupano; iv) Ursano.

Tabela 2 - Rendimentos das frações lipofílicas das várias partes morfológicas de *Cynara cardunculus* L. var. *altilis* DC (35).

Parte morfológica de <i>Cynara cardunculus</i> L. var. <i>altilis</i> DC		Rendimento de extração (% , m/m)
Caule	Parte exterior	1,0
	Parte interior	2,0
Capítulos	Recetáculo e brácteas	3,3
	Flor	4,5
Folhas		17,3

As lactonas sesquiterpénicas (STLs) são um grupo de metabolitos secundários presente em todo o reino vegetal que compreende mais de 5000 compostos conhecidos (36). As STLs são mais comuns em famílias como a *Cactaceae*, *Solanaceae*, *Araceae* e *Euphorbiaceae*, e em particular na família *Asteraceae* (37,38). As STLs encontram-se localizadas nos laticíferos, células secretoras especializadas na maior parte das plantas *Asteraceae*, podendo também ser encontradas no interior dos vacúolos de outros tipos celulares na planta, quando são produzidos em resposta ao *stress* biótico (39). As STLs são na sua maioria isoladas a partir das folhas e inflorescências das plantas, onde podem constituir até 5 % do seu peso seco (40).

As STLs são sesquiterpenóides incolores e componentes importantes de alguns óleos essenciais. Estas apresentam uma cadeia de 15 carbonos e os principais tipos são classificados com base nos seus esqueletos, nomeadamente germacranolido, guaianolido, pseudoguaianolido, eudesmanolido, eremofilanolido, elemanolido, cadinanolido e xantonolido (Figura 6) (41). No cardo as STLs do tipo guaianolido são a principal família de compostos lipofílicos das folhas (Figura 7), e dentro destas, o composto presente em maior abundância nas folhas é a cinaropicrina (35) (42) (Figura 8). Este composto é muito solúvel em álcool e apresenta uma solubilidade baixa em água, de cerca de 1,75 g / L a 20 °C (43).

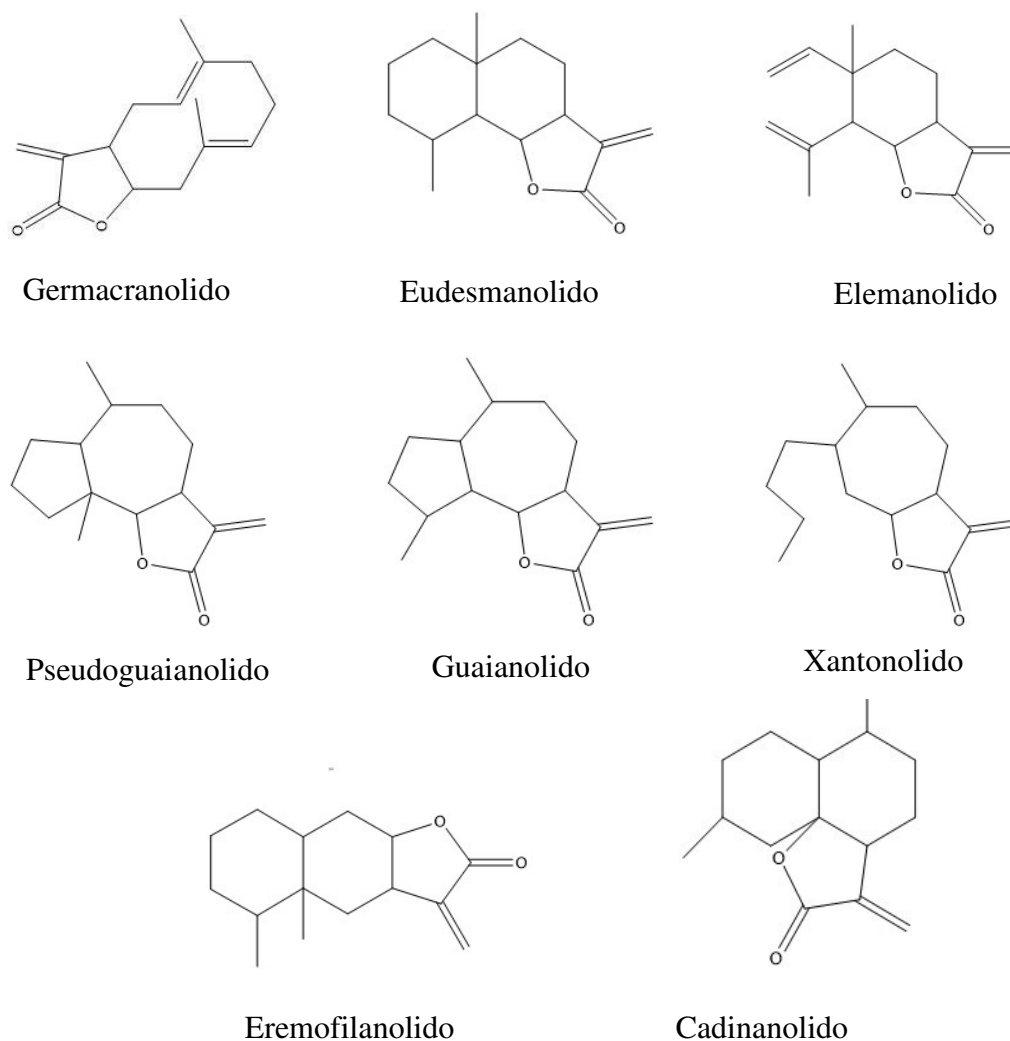


Figura 6 – Principais estruturas químicas das lactonas sesquiterpénicas mais comuns.

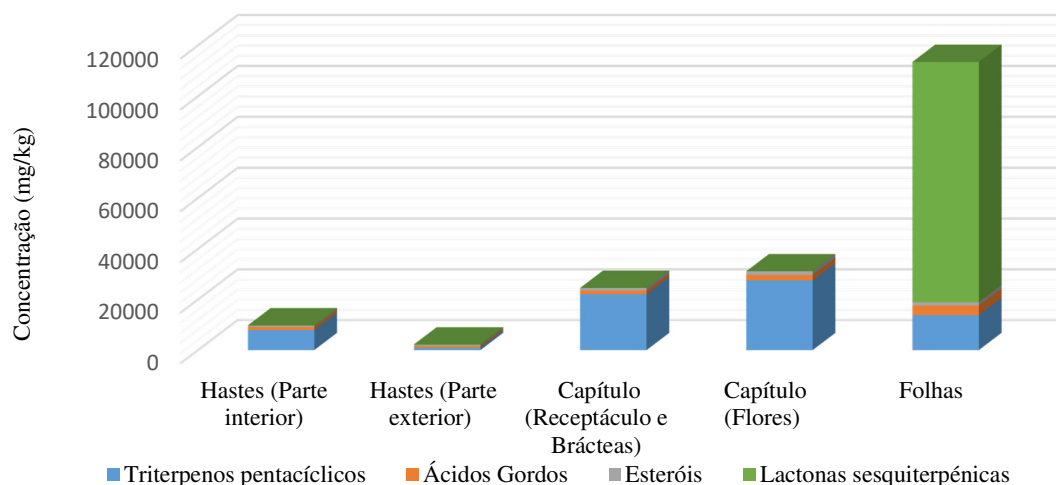


Figura 7 – Principais famílias de compostos lipofílicos presentes nas diferentes partes morfológicas de *C. cardunculus L. var. altilis* (DC) (mg de composto / kg de peso seco). Adaptado de (35).

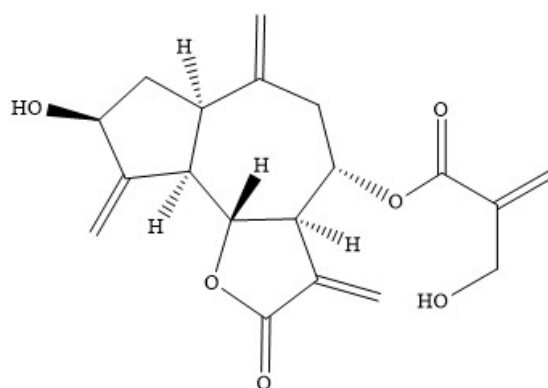


Figura 8 - Estrutura química da cinaropicrina.

No cardo, e como já referido para as STLs, a cinaropicrina acumula-se principalmente nos tecidos foliares, encontrando-se em menores concentrações quer no receptáculo, quer nas brácteas das inflorescências exteriores (35). Este composto encontra-se em maior quantidade no cardo selvagem, estando também presente em concentrações elevadas no cardo cultivado e na alcachofra. No entanto, a atividade agrícola tem vindo a seleccionar progressivamente as formas com menor concentração de lactonas sesquiterpénicas, devido ao seu sabor amargo derivado da presença destes compostos (44–46).

O mecanismo de defesa contra a predação envolvendo as STLs passa pela sua alquilação com o estabelecimento de ligações covalentes com macromoléculas

biológicas. Apesar do vasto grupo de STLs, existem outros grupos menores em que a atividade biológica não depende da alquilação de biomoléculas, mas de interações não-covalentes com recetores específicos (47).

A cinaropicrina, como muitas outras lactonas sesquiterpénicas, apresenta um vasto leque de atividades biológicas: citotoxicidade contra vários tipos de células tumorais, sendo um potencial agente anticancerígeno (48) e efeito inibitório sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), tendo a sua utilização sido sugerida para o tratamento de doenças inflamatórias agudas e crónicas (49, 50). As suas propriedades citotóxicas e pré-apoptóticas têm sido amplamente estudadas em várias linhas celulares de cancro, demonstrando-se que a cinaropicrina inibe a proliferação celular em várias linhas de cancro tais como U937, Eo1-1 e células T de Jurkat, através da indução de apoptose (49).

A cinaropicrina apresenta outros efeitos benéficos para a saúde humana, como a inibição do foto-envelhecimento da pele, uma vez que esta lactona inibe a transativação dos genes alvo do fator nuclear κ B (NF- κ B), bloqueando a translocação nuclear de NF- κ B. Sendo o NF- κ B o principal fator no processo de fotoenvelhecimento da pele, a cinaropicrina demonstra-se eficiente na inibição deste (44). Outro exemplo das propriedades farmacológicas deste composto contempla a inibição da produção de mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico, e a proliferação de linfócitos, como a concanavalina A e a fito-hemaglutinina. O mecanismo de ação da cinaropicrina nestas respostas mitogénicas está relacionado com a interação com os grupos sulfidrílo da proteína alvo (50). Finalmente, a cinaropicrina é o principal composto ativo responsável pelo efeito relaxante do músculo liso observado no extrato e frações de *C. cardunculus*, apresentando assim uma forte atividade antiespasmódica, justificando a sua utilização popular para combater problemas gastrointestinais através de chá das folhas desta planta (51).

Os compostos fenólicos são constituídos por um ou vários anéis aromáticos, contendo um ou mais substituintes hidroxilo. O esqueleto fenólico permite classificar os vários compostos fenólicos como: 1) fenóis simples e benzoquinonas; 2) ácidos fenólicos; 3) ácidos fenilacéticos; 4) fenilpropenos, ácido cinâmico e hidroxicinâmico, cromonas e cumarinas; 5) naftoquinonas; 6) xantonas; 7) estilbenos e antraquinonas; 8) flavonoides; 9) lignanos; e 10) biflavonoides. Os ácidos fenólicos apresentam um conjunto vasto de

propriedades biológicas, tais como antioxidante, anti-alérgica, anti-inflamatória, antimicrobiana, efeito vasodilatador, entre muitas outras (52).

No cardo cultivado o conteúdo fenólico varia consoante as diferentes partes morfológicas. As hastes exteriores, as brácteas e o recetáculo são as partes da planta que apresentam os teores mais elevados de compostos fenólicos, e as folhas apresentam um teor muito reduzido (53). Os ácidos hidroxicinâmicos (Figura 9) representam a maior família de compostos fenólicos presente nos extratos de cardo cultivado, essencialmente nas hastes exteriores que contêm cerca de 59,1 mg / g de extrato. Os ácidos dicafeoilquínicos são os compostos mais abundantes desta família. Nas flores, os flavonoides são os compostos fenólicos mais abundantes, correspondendo a cerca de 30,7 mg / g de extrato (53) (Figura 10).

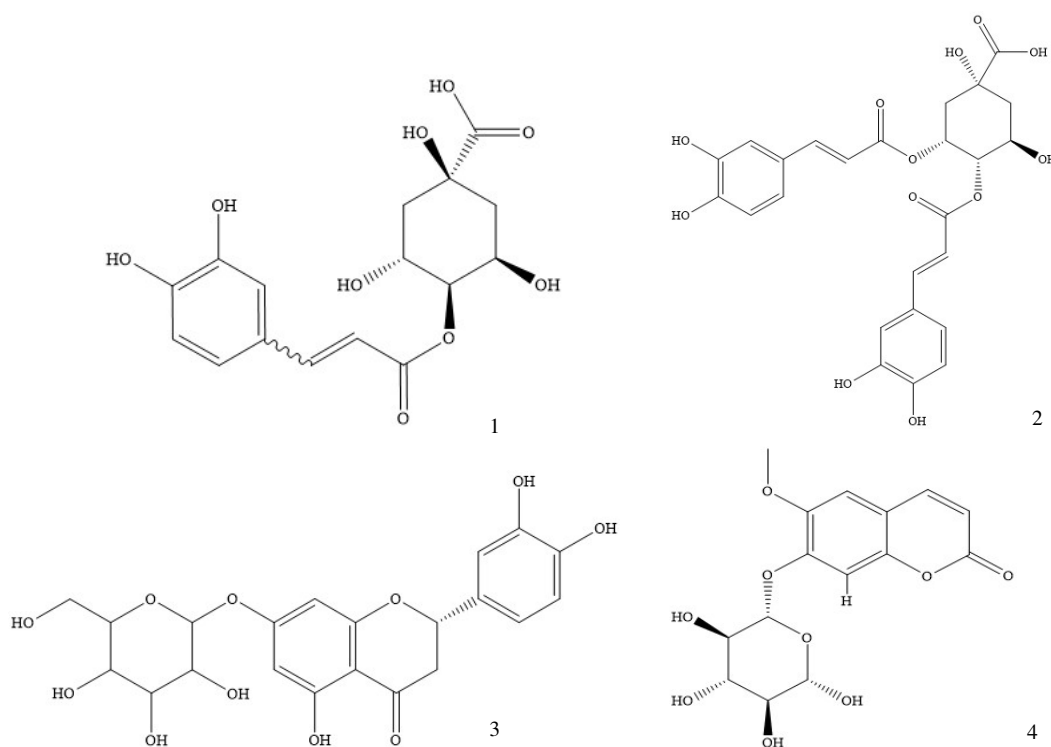


Figura 9 - Exemplos de compostos fenólicos presentes no cardo [1 e 2-ácidos hidroxicinâmicos (ácido 4-O-caffeoilquínicos; ácido 4,5-di-O-caffeoilquínicos); 3-flavonóide (eriodictiol hexoside); 4-cumarina (escopolina)].

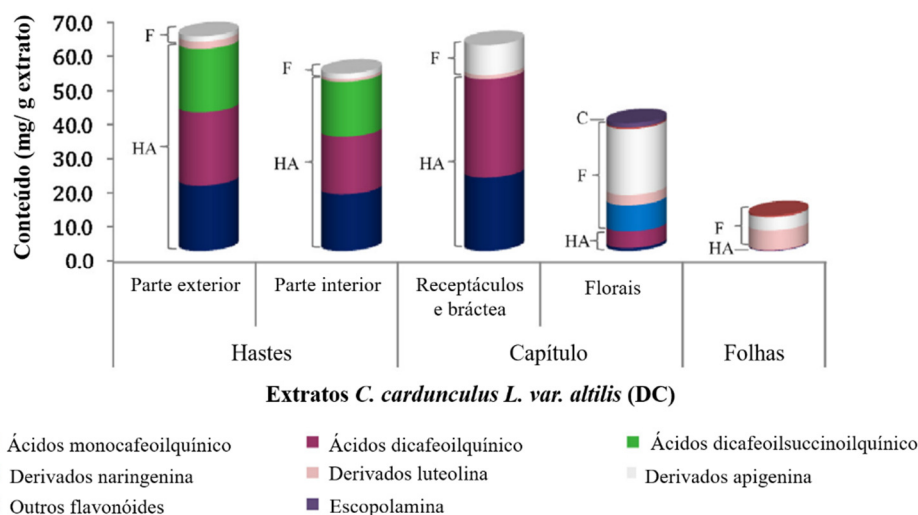


Figura 10 - Composição fenólica dos extratos de metanol / água / ácido acético (49,5:49,5:1) a partir de várias partes morfológicas de *C. cardunculus L. var. altilis* (DC) (C-cumaridas; F- flavonóides e HA-ácidos hidroxicinâmicos). Adaptado de (53).

Tendo em conta as inúmeras propriedades e aplicações dos compostos bioativos presentes no cardo, e em particular a cinaropicrina, a extração deste composto bioativo de alto valor comercial (18 €/mg, $\geq 97,5$ %) (54) a partir desta biomassa considera-se extremamente promissora, contribuindo assim para a valorização desta espécie e para o desenvolvimento económico das regiões do Mediterrâneo.

1.3. Extração de compostos bioativos

A extração é o primeiro passo para a análise da composição química, e posterior valorização de extratos de plantas. Esta baseia-se na transferência de massa de um ou mais compostos a partir da biomassa para um determinado solvente. A solubilidade de um composto no solvente usado é um dos parâmetros fundamentais no processo de extração e pode ser previsto com base no conhecimento da sua polaridade e miscibilidade (55). Por exemplo, na extração de compostos lipofílicos são utilizados solventes como o hexano ou o diclorometano, e na extração de compostos hidrofílicos são utilizados solventes polares, como água, metanol e etanol (56).

Após a seleção do solvente mais adequado, a transferência dos compostos da biomassa para o solvente implica a penetração deste no interior da matriz e a dissolução e remoção do composto a partir dos locais onde se encontra (57). A preparação prévia da

matéria-prima, através da secagem ou liofilização e moagem, é essencial para obter uma amostra homogênea e para facilitar a penetração do solvente (58). A extração Soxhlet, a maceração, a decocção e percolação são os métodos convencionais mais utilizados na extração de compostos bioativos das plantas (58), e também da cinaropicrina.

A maceração e decocção são exemplos deste tipo de extração, representado a primeira escolha dos curandeiros tradicionais que utilizavam normalmente água como solvente (59). Na maceração, as matérias-primas são colocadas com o solvente num recipiente fechado, ficando durante um período mínimo de 3 dias com agitação frequente (60). Posteriormente, o extrato é filtrado ou decantado. Na extração por Soxhlet (Figura 11), o solvente é aquecido à sua temperatura de ebulição e posteriormente condensado com o auxílio de um condensador para o interior do cartucho de papel que contém a amostra, dentro da câmara do extrator Soxhlet. A câmara enche lentamente com o solvente aquecido e quando o nível de líquido atinge a parte superior do sifão, os solventes voltam para o balão, pelo braço lateral do sifão, repetindo-se os ciclos de destilação-condensação do solvente (60). Para separar os componentes de uma amostra de acordo com a sua polaridade, é necessário realizar extrações sequenciais com solventes de polaridade crescente, tais como n-hexano, diclorometano, acetato de etilo e metanol (59), tal como esquematizado na Figura 11.

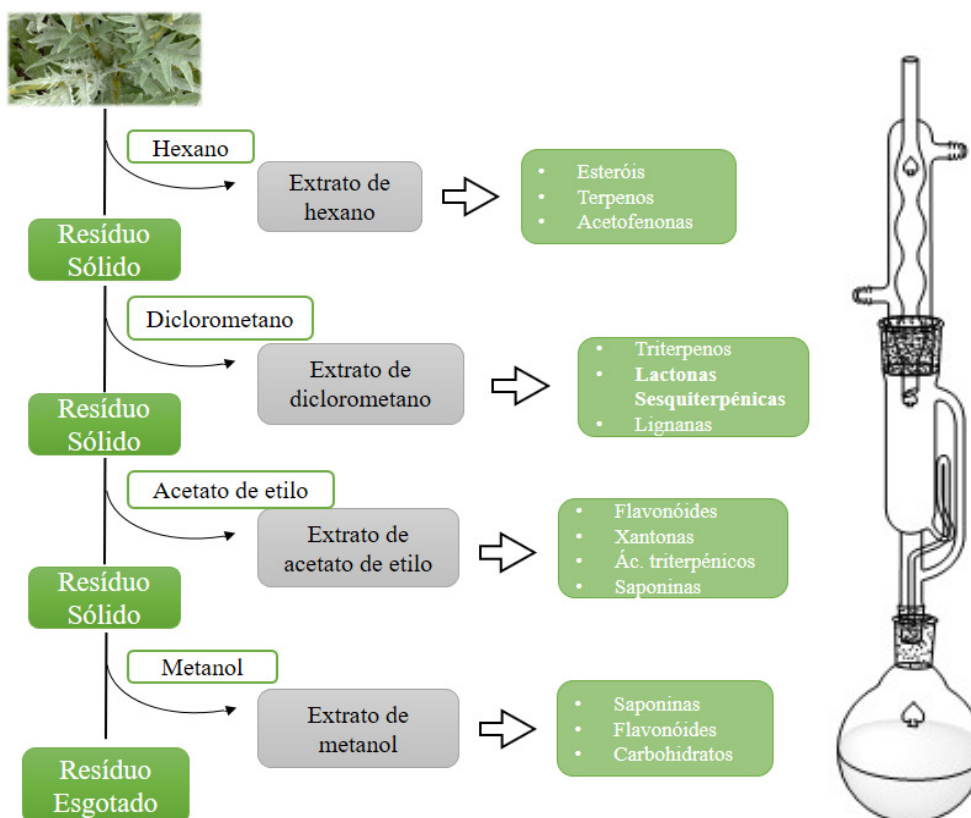


Figura 11 - Esquema geral de partição e separação dos principais metabólitos secundários presentes nas plantas (64,66) e representação esquemática da extração por Soxhlet.

De entre os vários sistemas convencionais de extração utilizados para a extração da cinaropicrina (Tabela 3) destacam-se a extração por Soxhlet e maceração, assim como sistemas alternativos recorrendo a fluidos supercríticos (35,51,61).

Tabela 3 – Métodos de extração de cinaropicrina a partir de várias matérias-primas.

Matéria-prima	Métodos de extração	Solventes	Método de análise	Referência
<i>Cynara scolymus</i> (guinea-pig ileum)	Maceração	Metanol, Hexano, Diclorometano, Acetato de etilo, Butanol.	-	(51)
<i>Cynara cardunculus</i> L. var. <i>altilis</i> (DC)	Soxhlet	Diclorometano	GC-MS; RMN.	(35)
<i>Leuzea carthamoides</i> DC	Fluidos supercríticos	Dióxido de carbono supercrítico (SC-CO ₂) com etanol	HPLC	(61)
<i>Cynara scolymus</i> L. (Minor artichoke)	Maceração	Etanol-Água.	HPTLC; HPLC.	(62)
<i>Centaurea omphalotricha</i>	Maceração	Etanol, Água, Clorofórmio, Acetato de etilo, Butanol, Metanol, Diclorometano.	RMN	(63)

A caracterização dos extratos obtidos a partir de qualquer método é um passo essencial, por um lado numa fase inicial para avaliar o seu potencial, e posteriormente para controlar a eficiência dos processos e a qualidade dos extratos obtidos. Os métodos de análise normalmente empregues para a deteção da cinaropictina em amostras de cardo são a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a detetores *diode array* (DAD) ou de espectrometria de massa, e a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) (35,62). A GC-MS é uma técnica que combina as propriedades de separação da cromatografia gás-líquido, com a capacidade de gerar informação espectroscópica de identificação e quantificação de vários compostos (64,65). O HPLC é a técnica mais utilizada na deteção e quantificação da cinaropictina. Esta técnica permite a separação dos constituintes da amostra consoante as afinidades relativas das diferentes moléculas para a fase móvel e estacionária (65). Finalmente, a ressonância magnética nuclear (RMN) é fundamental na caracterização estrutural de compostos naturais, nomeadamente a cinaropictina (35,63), exigindo no entanto o fracionamento prévio dos extratos.

A termolabilidade e polaridade dos compostos de interesse, as características do solvente, como a toxicidade, volatilidade, polaridade e viscosidade são fatores importantes na escolha do processo e solvente de extração (65,66). Os métodos de extração convencionais apresentam várias limitações tais como o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos, tempo de extração longo, e em alguns casos baixos rendimentos de extração / purificação (67). Nos últimos anos o desenvolvimento de técnicas de extração alternativas permitiu ultrapassar alguns destes problemas.

1.3.1. Métodos alternativos de extração de compostos bioativos

No final da década de 70, os métodos convencionais de extração de compostos bioativos usando solventes orgânicos começaram a ser substituídos por técnicas alternativas, mais seletivas, com menos problemas de toxicidade, menor consumo energético e mais sustentáveis, recorrendo a solventes alternativos mais benignos. Entre os solventes considerados mais promissores destacam-se a água (68), o glicerol (69), o lactato de etilo (70), os fluidos supercríticos (71), os líquidos iónicos (72), entre outros. Por outro lado, a extração assistida por micro-ondas e por ultrassons são consideradas técnicas promissoras uma vez que ultrapassam um dos problemas das extrações convencionais mencionado anteriormente, o elevado tempo de extração (73,74).

A extração com fluidos supercríticos permite superar muitas limitações dos solventes convencionais. Esta técnica utiliza, comumente, o dióxido de carbono como fluido supercrítico (SC-CO₂). Este solvente apresenta várias características benéficas, entre as quais o facto de ser inócuo para a saúde humana e para o meio ambiente, e apresentar uma temperatura e pressão críticas moderadas (31,2 °C e 72,9 atm respetivamente), permitindo a preservação dos compostos bioativos, prevenindo ainda o contacto do extrato com o ar e impedido reações de oxidação (75). A extração com SC-CO₂ permite a obtenção de um extrato isento de solvente, uma vez que após a extração e descompressão do sistema, o CO₂ gasoso é facilmente eliminado. Devido à sua baixa viscosidade e elevada difusividade, os fluidos supercríticos difundem facilmente através de materiais sólidos, tornando o processo de extração mais rápido (75). Por outro lado, a degradação dos compostos extraídos e a contaminação da amostra com impurezas são fatores superados por esta técnica (61). No entanto, devido à sua baixa polaridade, o SC-CO₂ é menos eficiente na extração de compostos mais polares, recorrendo-se normalmente à utilização de co-solventes (76,77), como o etanol e a água (78). Finalmente, o elevado investimento financeiro para os equipamentos necessários e o elevado tempo de extração são as principais desvantagens da extração com SC-CO₂ (7,61).

Os líquidos iónicos (ILs) têm estado em foco nos últimos anos devido às suas propriedades únicas, que permitem a sua utilização em alternativa aos solventes orgânicos na separação e melhoria da análise de componentes de valor acrescentado extraídos a partir da biomassa (79). Os ILs são sais que se caracterizam por apresentar pontos de fusão baixos, normalmente inferiores a 100°C, sendo maioritariamente líquidos à temperatura ambiente, e apresentam uma pressão de vapor desprezável, apresentando também uma elevada estabilidade térmica. Estes são constituídos por catiões orgânicos (normalmente de maior tamanho) e aniões orgânicos ou inorgânicos (mais pequenos), podendo ambos ser seleccionados consoante as polaridades e afinidades para os compostos de interesse (80). Dada a grande diversidade de catiões e aniões, a diversidade de ILs disponíveis é muito elevada, apresentando várias propriedades interessantes, como a viscosidade variável, miscibilidade com água e solventes orgânicos, e propriedades de solvatação favoráveis para um amplo espectro de compostos polares e não polares (80). Assim, é possível ajustar a afinidade dos ILs para compostos específicos, aumentando consideravelmente a eficiência de extração. De facto, um número significativo de estudos

demonstrou o potencial dos ILs, puros ou em solução aquosa, na extração de compostos bioativos, como por exemplo alcalóides, terpenos, flavonóides, corantes naturais e lípidos a partir de fontes naturais (79).

Em 2003, Abbott e colaboradores (82) apresentaram um novo tipo de solventes, os solventes eutécticos profundos (*Deep Eutectic Solvents, DES*), constituídos por dois compostos sólidos com pontos de fusão elevados que por mistura formam um líquido à temperatura ambiente, sendo o grande exemplo conhecido a mistura de cloreto de colina e ureia (Figura 12). As fortes ligações por pontes de hidrogénio que ocorrem entre um dador (HBD) e um aceitador (HBA) de prótons são o fenómeno responsável pela grande diminuição no ponto de fusão da mistura em relação ao ponto de fusão dos componentes individuais (83). A diferença do ponto de fusão da mistura eutéctica em comparação com uma mistura ideal, relaciona-se com a interação entre A e B. Assim, o ponto eutéctico da mistura é inferior ao estimado pela mistura ideal (Figura 13) (84).

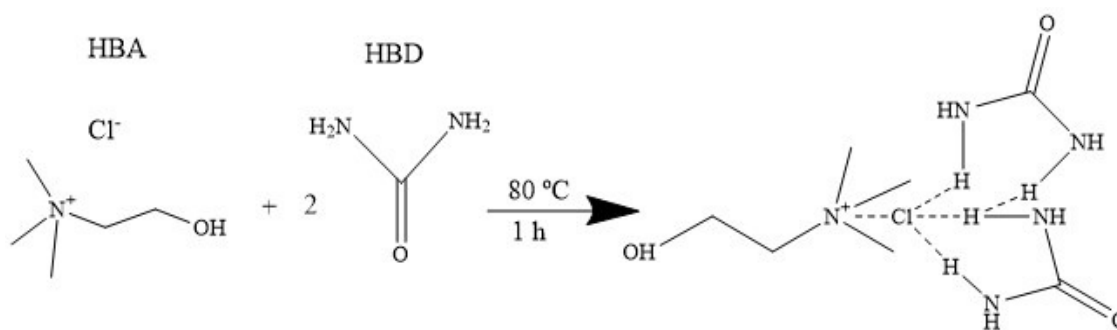


Figura 12 - Formação de um DES (mistura de ureia e cloreto de colina). Adaptado de (85).

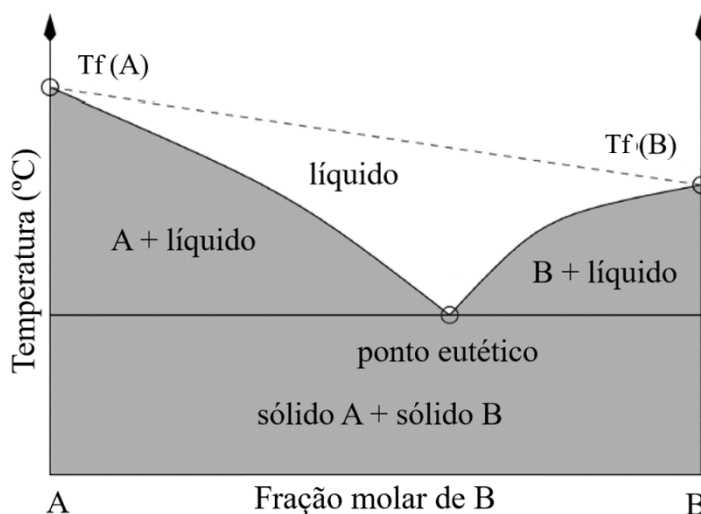


Figura 13– Diagrama de fases de uma mistura eutéctica com dois componentes. Adaptado de (84).

A combinação de diferentes HBDs e HBAs capazes de originar misturas eutéticas são inúmeras (Figura 14). Os DES apresentam propriedades químicas diferentes dos líquidos iônicos convencionais, mas propriedades físicas semelhantes, nomeadamente o seu potencial como *designer* solvents, sendo ainda mais flexíveis. Uma vez que não ocorre qualquer reação entre o HBD e o HBA, é possível a obtenção de DES numa gama alargada de composições molares relativas, utilizando-se normalmente as proporções de 1:2, 1:1, 2:1 de HBD e HBA (83).

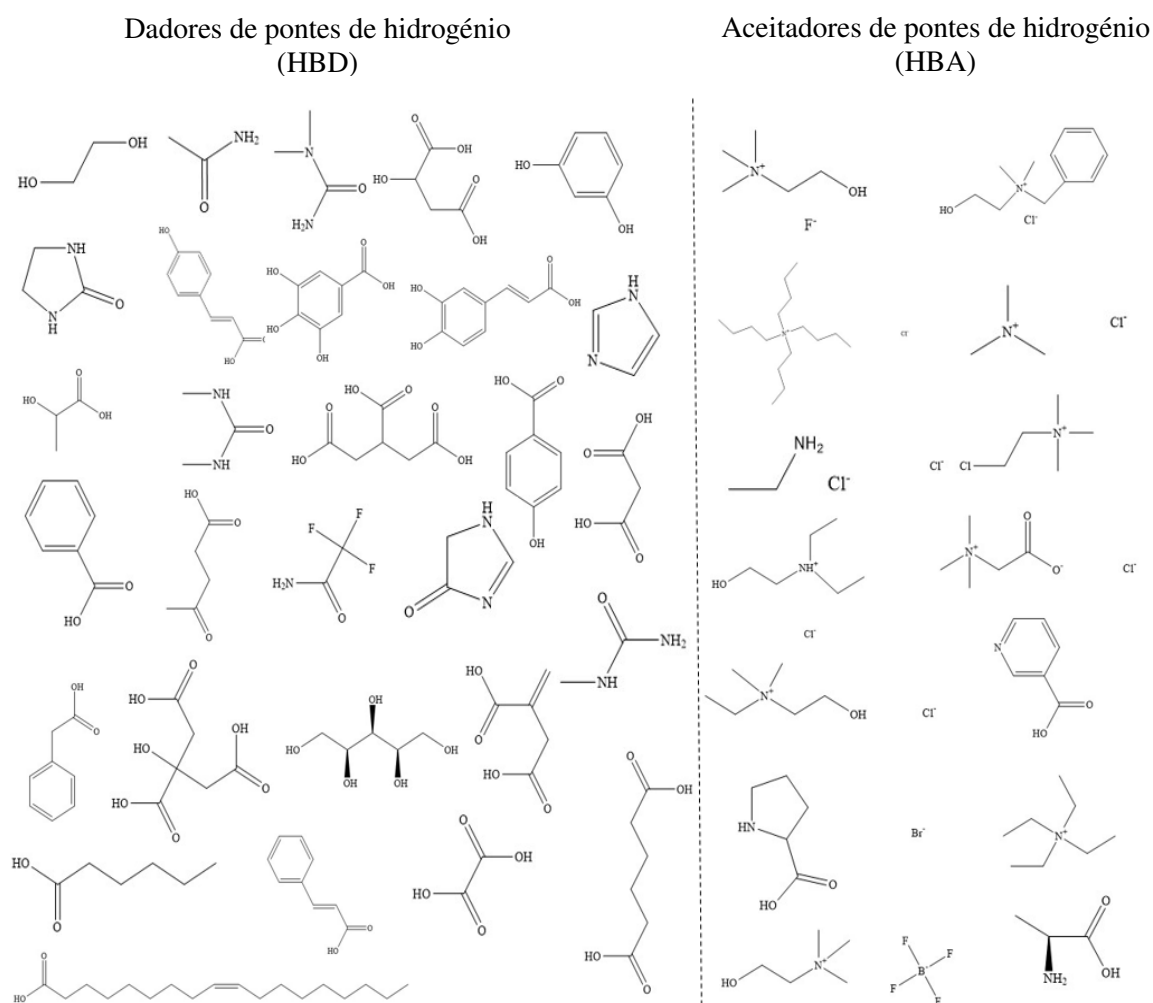


Figura 14 - Estruturas de HBD e HBA que podem ser combinados para formar (NA)DES. Adaptado de (82).

Os DES apresentam características relevantes, como uma baixa pressão de vapor e a sua fácil preparação, uma vez que estes podem ser formados pela simples mistura dos compostos a temperaturas moderadas sem necessidade de um passo de purificação adicional (83). A maioria destes solvents apresentam uma densidade superior à água,

elevados valores de viscosidade à temperatura ambiente (> 100 cP) quando comparados com a viscosidade da água ($\sim 1,0$ cP), e valores de condutividade inferiores aos dos líquidos iônicos (86). A viscosidade dos DES varia de acordo com a natureza dos componentes da mistura, a temperatura e quantidade de água presente na mistura (86). A fácil disponibilidade dos componentes da mistura e uma caracterização toxicológica bem conhecida da maior parte destes são outras vantagens destes solventes (87).

Os solventes eutécticos profundos naturais (NADESs) são DES compostos por HBD e HBA de origem natural, e recentemente têm-se revelado solventes muito promissores (88–90). A origem natural dos NADESs (incluindo frequentemente componentes presentes na alimentação humana, ou já validados em diversas formulações nutraceuticas), são assim considerados seguros, sustentáveis e baratos. Os NADESs apresentam viscosidade ajustável, podem ser líquidos a temperaturas inferiores a 0 °C, apresentam elevada capacidade de solubilização para compostos não polares e polares, bem como potencial para a dissolução de macromoléculas, reforçando o seu potencial como solventes para a extração de compostos de valor acrescentado para aplicação na indústria alimentar e/ou fitofarmacêutica (91).

Nos últimos anos, a aplicação de NADES aumentou em larga escala, desde processos de catálise (92), de síntese (93), de eletroquímica (94), de dissolução de substâncias (95), de separação (96), de preparação de materiais (97) e de extração (86). No campo da catálise, os NADES permitem melhorar o contacto entre os reagentes e catalisadores, contribuindo para processos eco-eficientes (86). A dissolução mais eficiente de substâncias em NADES, como fármacos (danazol, itraconazol), comparada com meios de dissolução como a água, é outro exemplo da aplicação destes solventes (98). Nos processos de separação, a utilização de NADES é importante devido à sua elevada polaridade. Assim, estes solventes permitem, por exemplo, a separação do glicerol residual a partir do biodiesel, através de extrações do tipo líquido-líquido (99). No entanto, na separação de compostos lipofílicos com NADES, a elevada polaridade destes solventes apresenta-se como um problema. Em 2015, Dannie e colaboradores (100) apresentaram um novo tipo de misturas eutécticas, os DES hidrofóbicos, compostos por ácido decanóico (HBD) e vários sais de amónio quaternários (HBA) (100).

Na Tabela 4, encontram-se sumariados vários estudos de extração de compostos bioativos a partir de plantas, entre os quais terpenóides e compostos fenólicos, utilizando NADES como solventes. Os métodos de extração variam desde uma agitação simples

com o solvente até à extração assistida por micro-ondas. É possível constatar que estes solventes permitem geralmente uma extração eficiente, e onde a quantificação do composto alvo ocorreu por HPLC, num período de 30 minutos a 1 hora (88,91,101), muito inferiores aos usados nos vários métodos de extração convencionais (entre várias horas a alguns dias) (35,62,63). De um modo geral, nos vários estudos sumariados na Tabela 4, observou-se uma elevada seletividade dos NADES para a extração de compostos bioativos, resultando em rendimentos de extração superiores aos obtidos com métodos de extração convencional.

Vários autores (88,91,102) analisaram a capacidade de extração de compostos fenólicos com NADES. Nestes estudos, verificou-se que a quantidade de água presente no NADES influencia a eficiência de extração e, de uma forma geral, devido ao efeito sinérgico, as soluções aquosas com menor quantidade de NADES apresentaram um melhor desempenho na extração de compostos mais polares do que a água ou NADES puro (91). Assim, a utilização de uma solução aquosa de NADES ao invés do NADES puro, permite aumentar ainda mais a sustentabilidade da extração de compostos bioativos, uma vez que é mais eficiente, apresenta um menor custo associado, e apresenta uma viscosidade menor, o que por sua vez facilita a transferência de massa (91). Um estudo da extração de terpenóides voláteis a partir de fontes naturais, demonstrou que estes solventes no processo de *headspace* com micro-extração em fase líquida permitem uma extração simples e eficiente, quando comparados com as extrações por ultrassons, utilizando metanol como solvente (103). Por fim, os compostos envolvidos na formação do NADES são facilmente recuperáveis devido à inexistência de reações químicas durante a sua formação (83).

Tabela 4 - Exemplos de extrações de compostos bioativos a partir de diferentes espécies vegetais com recurso a DES.

Espécie / (Compostos alvo)	DES	Método de extração	Método de identificação / quantificação	Referência
<i>Cajanus cajan</i> (Compostos fenólicos)	Cloreto de colina com ácidos orgânicos ou álcoois; Ácido cítrico ou láctico com açúcares	Extração assistida por micro-ondas	Cromatografia líquida de ultra performance (UPLC)	(88)
<i>Pyrola incarnata</i> (Compostos fenólicos)	Cloreto de colina com glicerol	Extração assistida por micro-ondas; Extração assistida por ultrassons e por agitação e aquecimento	HPLC	(102)
<i>Carthamus tinctorius</i> (Compostos fenólicos)	Cloreto de colina com Sacarose Ácido málico com Prolina Ácido láctico com Glucose	Extração com DES usando agitação e aquecimento	HPLC	(91)
<i>Flos sophorae</i> (Flavonóides)	Cloreto de colina ou ácido cítrico com açúcares	Extração com DES usando agitação, aquecimento e irradiação ultrassons	Cromatografia líquida acoplada com detetor UV (LC-UV)	(104)
<i>Radix scutellariae</i> (Flavonóides)	Cloreto de colina com álcoois ou açúcares	Extração assistida por micro-ondas	HPLC	(105)
<i>Chamaecyparis obtusa</i> (Flavonóides)	Cloreto de colina com álcoois	Extração com DES usando agitação, aquecimento e irradiação ultrassons	HPLC	(101)
<i>Equisetum palustre</i> (Flavonóides)	Cloreto de colina com álcoois	Extração com DES assistida por cavitação de pressão negativa e ultrassons	HPLC	(106)
<i>Agave sisalana; Ziziphus joazeiro</i> (Saponinas; polióis)	Cloreto de colina com ácidos orgânicos ou álcoois; Cloreto de colina com Ureia	Extração com DES usando agitação e aquecimento	Ácido sulfúrico-vanilina Folin Denis usando espectrofotómetro	(89)
<i>Herba artemisiae scopariae</i> (Ácidos fenólicos)	Cloreto de tetrametilamónio com ureia; Cloreto de colina com álcoois	Extração com DES usando agitação, aquecimento e ultra-sons	HPLC	(107)
<i>Chamaecyparis obtusa</i> (Terpenóides)	Cloreto de colina com Etilenoglicol	Headspace com micro-extração em fase líquida	Cromatografia gasosa acoplada com detetor por ionização em chama (GC-FID)	(103)

O conhecimento das propriedades físicas e químicas dos DES, como temperatura de fusão, densidade, viscosidade e capacidade de solvatação é fundamental na escolha do melhor solvente para a extração de um composto específico. A polaridade assume-se como uma das características mais importantes dos DES quando utilizados como solventes. Os solventes classificam-se, muitas vezes, consoante a sua capacidade de dissolver espécies polares e carregadas. Os parâmetros solvatocrómicos ou de *Kamlet-Taft* são normalmente utilizados para caracterizar solventes em termos de capacidade de doar (acidez, α) ou aceitar (basicidade, β) prótons, e polarizabilidade (π^*) (108). De salientar que os corantes/*probes* utilizados para este tipo de caracterização e as abordagens experimentais utilizadas podem originar diferentes valores destes parâmetros para o mesmo solvente. Com o objetivo de determinar o parâmetro π^* , existem muitos corantes que podem ser utilizados e nem todos originam valores idênticos. Laurence e os seus colaboradores (109) propuseram a utilização dos corantes 4-nitroanisole e *N,N*-dimetil-4-nitroanilina. O corante *N,N*-dimetil-4-nitroanilina é o mais utilizado na caracterização dos DES. Na determinação dos parâmetros β e α , os corantes mais utilizados são o 4-nitroanilina e o corante de *Reichard*, respetivamente (110). Na Tabela 5, encontram-se alguns exemplos destes parâmetros para vários solventes, desde solventes orgânicos, líquidos iónicos e DES. Estes parâmetros, em conjunto, podem ser utilizados para prever uma vasta gama de outros parâmetros, como constantes de velocidade, constantes de equilíbrio, solubilidades e frequências espectrais (111).

Tabela 5 - Parâmetros solvatocrómicos Kamlet-Taft de vários solventes, utilizando o corante de Reichard, 4-nitroanilina e *N,N*-dimetil-4-nitroanilina (110).

Solvente	α	β	π^*
Etanol	0,83	0,77	0,54
Acetato de etilo	0,00	0,45	0,55
Benzeno	0,00	0,10	0,59
Metanol	0,93	0,62	0,60
Acetonitrilo	0,19	0,31	0,75
Diclorometano	0,30	-0,01	0,80
[ethylammonium][NO₃]	0,85	0,46	1,24
[1-butil-3-metilimidazólio][BF₄]	0,63	0,38	1,05
[3-metilpiridina octilo][Tf₂N]	0,50	0,33	0,97
Cloreto de colina: Glicerol (1:2)	0,94	0,66	0,98
Cloreto de colina: 1,4-Butanodiol (1:1)	0,65	0,79	1,17
Cloreto de colina: 1,2-Butanodiol (1:1)	0,80	0,75	0,94

Analisando a Tabela 5, verifica-se por exemplo que os DES apresentam parâmetros solvatocrômicos semelhantes ao metanol (solvente orgânico utilizado frequentemente na extração de compostos bioativos de plantas), com exceção do valor de π^* que é superior.

1.4. Objetivos

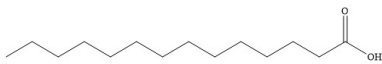
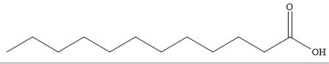
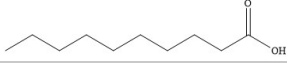
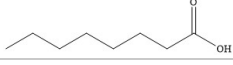
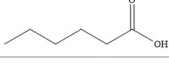
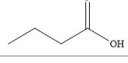
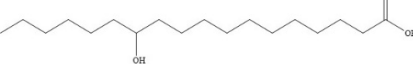
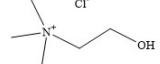
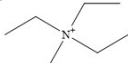
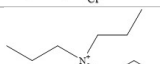
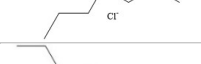
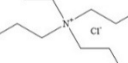
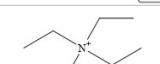
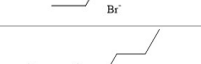
O objetivo principal deste trabalho consiste na extração da cinaropicrina a partir das folhas de *C. cardunculus* L., utilizando DES puros e soluções aquosas de DES como solventes alternativos, contribuindo para a valorização integral desta espécie e desenvolvimento da economia das regiões do Mediterrâneo. Dadas as inúmeras combinações possíveis de HBD:HBA capazes de originar misturas eutéticas, foram avaliadas as características de alguns DES baseados em sais de amónio e ácidos carboxílicos, nomeadamente, os seus parâmetros solvatocrómicos, viscosidades e densidades, assim como o seu estado físico à temperatura ambiente. Após a caracterização destes solventes, os DES mais promissores foram testados na extração de cinaropicrina a partir de amostras de *C. cardunculus* L previamente caracterizada recorrendo a métodos de extração convencionais e GC-MS. As condições de extração destes compostos foram otimizadas com o objetivo de se obterem rendimentos de extração e seletividade elevados. A otimização do processo de extração visou, igualmente, a criação de processos mais sustentáveis, realizando também um estudo de utilização de soluções aquosas de DES na extração de cinaropicrina. Por fim, avaliou-se a utilização de água como anti-solvente e a sua capacidade para induzir a precipitação e recuperar o composto alvo. Todas as etapas do processo de extração foram otimizadas tendo por base os resultados quantitativos obtidos por HPLC-DAD.

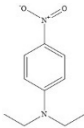
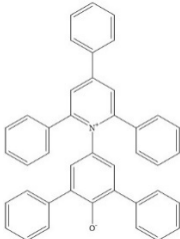
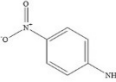
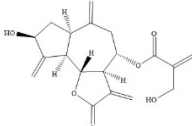



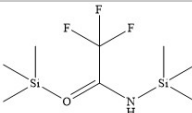




2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho encontram-se descritos na Tabela 6, com as purezas, fornecedores e estruturas químicas respectivas.

Tabela 6 - Reagentes utilizados neste trabalho (Reagente; Pureza; Fornecedor e Estrutura)

Reagente	Pureza	Fornecedor	Estrutura
Componentes do DES			
Ácido tetradecanóico	98 %	Fluka	
Ácido dodecanóico	99 %	Sigma-Aldrich	
Ácido decanóico	99 %	Acros Organics	
Ácido octanóico	98 %	Sigma-Aldrich	
Ácido hexanóico	99 %	Fluka	
Ácido butanóico	99 %	Sigma-Aldrich	
Ácido 12- hidroxisteárico	95 %	Alfa Aesar	
Cloreto de colina	99 %	Acros Organics	
Cloreto de tetraetilamónio [N₂₂₂₂]Cl	98 %	Sigma-Aldrich	
Cloreto de tetrapropilamónio [N₃₃₃₃]Cl	98 %	Sigma-Aldrich	
Cloreto de tetrabutilamónio [N₄₄₄₄]Cl	97%	Sigma-Aldrich	
Brometo de tetraetilamónio [N₂₂₂₂]Br	98 %	Sigma-Aldrich	
Brometo de tetrapropilamónio [N₃₃₃₃]Br	98 %	Sigma-Aldrich	
Brometo de tetrabutilamónio [N₄₄₄₄]Br	98 %	Sigma-Aldrich	

Reagente	Pureza	Fornecedor	Estrutura
Corantes – Parâmetros Solvatocrômicos			
<i>N,N</i>-dietil-4-nitroanilina	99 %	Fluorochem	
Reichardt	90 %	Sigma-Aldrich	
4-nitroanilina	99 %	Aldrich	
Composto alvo			
Cinaropirina	98 %	<i>Extrasynthese</i>	
Outros compostos			
Diclorometano	99,9 %	VWR	
Piridina	99,8 %	Aldrich	
Hexadecano	99 %	Aldrich	
<i>N,O</i>-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA)	99 %	Fluka	
Trimetilclorosilano (TMSCl)	>99 %	Fluka	
Acetonitrilo	99,99 %	Fisher Chemical	
<i>n</i>-hexano	99 %	Acros	
Acetona	100 %	VWR Chemical	

2.2. Preparação dos DES

A preparação de DES realizou-se adicionando massas conhecidas do HBD e o HBA a um frasco de vidro fechado, onde a mistura sólida foi homogeneizada por aquecimento sob agitação constante. A amostra foi aquecida gradualmente até a mistura formar um líquido transparente no interior do frasco. Após este passo, a mistura permaneceu 1 hora a esta temperatura e sob agitação. As temperaturas necessárias para atingir a fusão dos vários DES variaram entre os 70 °C e 140 °C. Para os ensaios com DES puros, as amostras de DES foram colocadas sob agitação constante, a vácuo e a uma temperatura de 25 °C, durante um período mínimo de 48 horas, para remover impurezas voláteis. A preparação dos vários DES encontra-se sumariada na Tabela 6. As soluções aquosas de DES foram preparadas pela adição do DES puro formado a água ultra-pura.

Tabela 7 - Combinações de HBD:HBA testadas na formação de DES.

Dador de pontes de hidrogénio (HBD)	Aceitador de pontes de hidrogénio (HBA)	Proporção utilizada (moles:moles)	Estado físico (temperatura ambiente)
Ácido butanóico	[N ₄₄₄₄]Br	2:1	Líquido
Ácido butanóico	[N ₄₄₄₄]Br	1:1	Líquido
Ácido butanóico	[N ₄₄₄₄]Br	1:2	Sólido
Ácido butanóico	[N ₄₄₄₄]Cl	2:1	Líquido
Ácido butanóico	[N ₄₄₄₄]Cl	1:1	Sólido
Ácido butanóico	[N ₄₄₄₄]Cl	1:2	Sólido
Ácido hexanóico	[N ₂₂₂₂]Br	2:1	Sólido
Ácido hexanóico	[N ₂₂₂₂]Cl	2:1	Líquido
Ácido hexanóico	[N ₃₃₃₃]Br	2:1	Sólido
Ácido hexanóico	[N ₃₃₃₃]Cl	2:1	Líquido
Ácido hexanóico	[N ₃₃₃₃]Cl	1:1	Sólido
Ácido hexanóico	[N ₃₃₃₃]Cl	1:2	Sólido
Ácido hexanóico	[N ₄₄₄₄]Br	1:1	Líquido
Ácido hexanóico	[N ₄₄₄₄]Br	2:1	Líquido
Ácido hexanóico	[N ₄₄₄₄]Br	1:2	Sólido
Ácido hexanóico	[N ₄₄₄₄]Cl	2:1	Líquido
Ácido hexanóico	[N ₄₄₄₄]Cl	1:1	Sólido
Ácido hexanóico	[N ₄₄₄₄]Cl	1:2	Sólido

Ácido hexanóico	Cloreto de colina	2:1	Sólido
Ácido hexanóico	Cloreto de colina	4:1	Sólido
Ácido octanóico	[N ₄₄₄₄]Br	2:1	Líquido
Ácido octanóico	[N ₄₄₄₄]Br	1:1	Sólido
Ácido octanóico	[N ₄₄₄₄]Br	1:2	Sólido
Ácido octanóico	[N ₄₄₄₄]Cl	2:1	Líquido
Ácido octanóico	[N ₄₄₄₄]Cl	1:1	Sólido
Ácido octanóico	[N ₄₄₄₄]Cl	1:2	Sólido
Ácido decanóico	[N ₂₂₂₂]Br	2:1	Sólido
Ácido decanóico	[N ₂₂₂₂]Cl	2:1	Líquido
Ácido decanóico	[N ₃₃₃₃]Br	2:1	Sólido
Ácido decanóico	[N ₃₃₃₃]Cl	2:1	Líquido
Ácido decanóico	[N ₄₄₄₄]Br	2:1	Líquido
Ácido decanóico	[N ₄₄₄₄]Br	1:1	Sólido
Ácido decanóico	[N ₄₄₄₄]Br	1:2	Sólido
Ácido decanóico	[N ₄₄₄₄]Cl	2:1	Líquido
Ácido decanóico	[N ₄₄₄₄]Cl	1:1	Líquido
Ácido decanóico	[N ₄₄₄₄]Cl	1:2	Sólido
Ácido decanóico	Cloreto de colina	1:1 / 2:1 / 1:2	Sólido
Ácido dodecanóico	[N ₃₃₃₃]Cl	2:1	Líquido
Ácido dodecanóico	[N ₃₃₃₃]Cl	1:1	Sólido
Ácido dodecanóico	[N ₃₃₃₃]Cl	1:2	Sólido
Ácido dodecanóico	[N ₄₄₄₄]Br	2:1	Líquido
Ácido dodecanóico	[N ₄₄₄₄]Br	1:1	Sólido
Ácido dodecanóico	[N ₄₄₄₄]Br	1:2	Sólido
Ácido tetradecanóico	[N ₄₄₄₄]Br	2:1	Sólido
Ácido 12-hidroxiesteárico	[N ₄₄₄₄]Br	1:1 / 2:1 / 1:2	Sólido
Ácido 12-hidroxiesteárico	[N ₃₃₃₃]Cl	1:1 / 2:1 / 1:2	Sólido
Ácido 12-hidroxiesteárico	Cloreto de colina	1:1 / 2:1 / 1:2	Sólido

2.2.1. Densidade e viscosidade de DES puros

A densidade e viscosidade dos DES previamente secos através de uma bomba de vácuo, foram determinadas utilizando um viscosímetro – densímetro automatizado SVM 3000 Anton Paar rotacional Stabinger, numa gama de temperaturas entre os 25 e 80 °C, com uma margem de incerteza de 0,02 °C. A viscosidade dinâmica apresenta uma incerteza relativa de 0,35 % e a densidade uma incerteza absoluta de $\pm 5 \times 10^{-4} \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$.

2.2.2. Parâmetros solvatocrômicos

Cerca de 500 μL das amostras de DES puras e em solução aquosa foram colocadas em vários *ependorfs*, às quais foram adicionados diferentes corantes sólidos, nomeadamente: Reichardt, *N*, *N*-dietil-4-nitroanilina ou 4-nitroanilina. Os corantes foram adicionados em pequenas quantidades até corar as amostras de DES. Todos os espectros foram registados à temperatura ambiente ($\approx 25 \text{ }^\circ\text{C}$), utilizando um espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2 controlado por um computador. Os valores dos parâmetros solvatocrômicos foram determinados com recurso às equações 1, 2, 3 e 4, apresentadas abaixo.

Os parâmetros solvatocrômicos foram determinados através da medição da absorvância do comprimento de onda máximo, aplicando as seguintes equações:

$$\pi^* = \frac{\nu_{N,N(\text{DES})} - \nu_{N,N(\text{ciclohexano})}}{\nu_{N,N(\text{DMSO})} - \nu_{N,N(\text{ciclohexano})}} \quad \text{Equação 1}$$

$$\beta = \frac{(\Delta\nu_{\text{DES}} - \Delta\nu_{\text{ciclohexano}}) \times 0,76}{\Delta\nu_{\text{DMSO}} - \Delta\nu_{\text{ciclohexano}}} \quad \text{Equação 2}$$

$$\Delta\nu = \nu_{N,N} - \nu_{4N} \quad \text{Equação 3}$$

$$\alpha = 0,0649 \times \left(\frac{28591}{\lambda_{\text{max R}}} \right) - 2,03 - (0,72 \times \pi^*) \quad \text{Equação 4}$$

Onde λ_{maxR} corresponde ao comprimento de onda da absorção máxima, e

$$\nu_{\text{corante}} = \frac{1}{\lambda_{\text{max}(\text{corante})}} \times 10^{-4}.$$

2.3. Extração da Cinaropicrina a partir das folhas do cardo

2.3.1. Extração por Soxhlet

A biomassa, *Cynara cardunculus* L. var *atilis* DC, proveniente da empresa CEBAL, apresentava-se seca e embalada sobre vácuo. Cerca de 3 g de folha seca de *C. cardunculus* L. foram utilizadas para extração por Soxhlet com 250 mL diclorometano, durante 6 horas. De seguida, o solvente foi evaporado sob vácuo até à secura, recorrendo a um evaporador rotativo a uma temperatura de 30 °C. O diclorometano foi escolhido uma vez que é um solvente específico para compostos lipofílicos (112). Os extratos secos foram pesados e os resultados expressos como percentagem de extrato por biomassa seca. No final do processo, o extrato foi armazenado para posterior injeção e análise por GC-MS.

2.3.2. Extração com DES e solventes orgânicos

Cerca de 0,25 e 0,125 g (consoante a razão sólido-líquido) da amostra de biomassa (seca e embalada sob vácuo) foram utilizadas para extração com solventes alternativos durante 2 horas, sob agitação constante de 1000 rpm e a 25 °C (Figura 15). A extração foi realizada em duplicado para cada conjunto de condições experimentais. Para os ensaios com DES, a quantidade de cinaropicrina no solvente foi determinada por HPLC – DAD, após um passo prévio de centrifugação. A injeção das várias amostras foi realizada em duplicado. Para além dos DES também se estudou água pura e os seguintes solventes orgânicos: *n*-hexano, acetona e diclorometano.

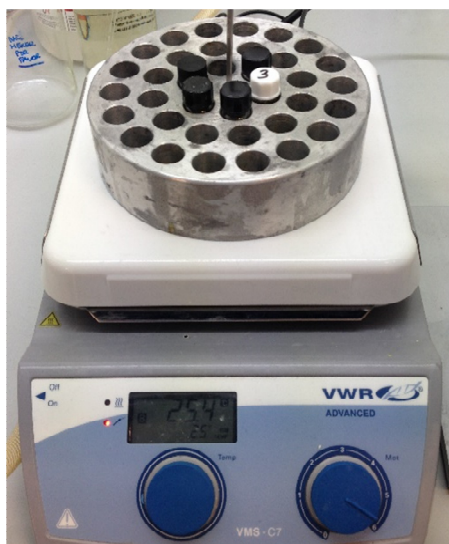


Figura 15 - Placa de aquecimento com agitação utilizada nas extrações com DES.

2.3.3. Otimização do processo de extração

A influência de vários parâmetros experimentais foi analisada na otimização do processo de extração de cinaropicrina. Os ensaios de otimização realizaram-se avaliando a influência dos parâmetros individualmente, mantendo as restantes condições de extração. Assim, selecionaram-se as condições que permitiram obter uma eficiência de extração superior, para avaliar os restantes parâmetros. As variáveis experimentais avaliadas foram o tempo (30min, 40min, 50min, 1h, 2h, 5h e 24h), a temperatura de extração (25 °C, 35 °C e 45 °C), a razão sólido-líquido biomassa-solvente (1:10; 1:20; 1:30; 1:40 e 1:50 m/m) e a quantidade de água no DES (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 100 m/m %).

2.3.3.1. Reutilização dos solventes e biomassa

De modo a desenvolver um método mais sustentável, realizaram-se 6 ciclos sucessivos de extração com a mesma biomassa e novas soluções aquosas de DES. Este estudo também permite inferir se as soluções aquosas de DES atingem a saturação. A biomassa foi filtrada em cada ciclo e novamente utilizada. Posteriormente, avaliou-se a capacidade de reutilização de DES na extração de cinaropicrina com nova biomassa. Realizaram-se 4 ciclos sucessivos de extração em cada caso, reutilizando a solução aquosa de DES, em cada um dos novos ciclos.

2.3.3.2. Recuperação da cinaropicrina extraída a partir dos extratos de DES

Após 4 ciclos de extração com a reutilização de solvente, a solução aquosa de DES obtida foi utilizada com duas finalidades: (1) quantificação da cinaropicrina por HPLC-DAD; (2) testes de recuperação da cinaropicrina. No teste de recuperação da cinaropicrina, e tendo por base o conceito de hidrotropia (113), adicionaram-se diferentes quantidades de água com o intuito de precipitar o produto alvo por diminuição da sua solubilidade/saturação. Cerca de 0,5 mL do extrato foram diluídos em 5, 10, 15, 25 e 50 mL de água desionizada, de forma a precipitar o composto alvo. Após a adição de água, centrifugou-se a solução a 6000 rpm durante 30 minutos, e filtrou-se sob vácuo com um filtro de membrana microporosa de 0,45µm. O resíduo sólido foi seco na estufa a 50 °C durante 2 dias, sendo depois quantificado gravimetricamente. A confirmação da precipitação de cinaropicrina, realizou-se redissolvendo uma amostra do precipitado em 9 mL de metanol que foi identificada e quantificada por HPLC-DAD. A pureza relativa do composto recuperado foi avaliada com base nas áreas dos vários picos obtidos pelo cromatograma do HPLC-DAD.

Em paralelo, realizou-se a quantificação por HPLC-DAD da cinaropicrina residual presente na fase líquida após diluição com água desionizada.

2.3.4. Caracterização do extrato em diclorometano de *C. cardunculus* L. por GC-MS

Após a extração com diclorometano, cerca de 10 mg de extrato seco foi dissolvido em 250 μL de piridina, contendo 1 mg de hexadecano (padrão interno). Os compostos com grupos hidroxilo e carboxilo foram convertidos em derivados trimetilsililados (TMS), pela adição de 250 μL de BSTFA e 50 μL de TMSCI. A mistura reacional foi mantida a 70 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 min.

As análises por GC-MS foram realizadas utilizando um cromatógrafo *Trace gas* (série 2000), equipado com um espectrômetro de massa *Thermo Scientific DSQ II*. A separação dos compostos foi realizada numa coluna capilar DB-1 da J & W (30 m \times 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura do filme), utilizando hélio como gás de arraste (35 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$). As condições cromatográficas utilizadas foram as seguintes: temperatura inicial de 80 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min; rampa de 4 $^{\circ}\text{C}$ por minuto até aos 260 $^{\circ}\text{C}$, seguido de uma rampa de 2 $^{\circ}\text{C}$ por minuto até aos 285 $^{\circ}\text{C}$; a temperatura de 285 $^{\circ}\text{C}$ foi mantida durante 20 min; temperatura do injetor de 250 $^{\circ}\text{C}$; temperatura da linha de transferência 290 $^{\circ}\text{C}$; razão de *split*: 1:33. O espectrômetro de massa foi usado no modo de ionização por impacto eletrónico (70 eV) e os dados obtidos foram recolhidos a uma velocidade de varrimento de 1 scan por segundo, ao longo de uma gama de massas de m/z 33-700. A fonte de ionização foi mantida a 250 $^{\circ}\text{C}$ (114). A cinaropicrina foi identificada por comparação do espectro de massa com uma amostra pura adquirida comercialmente e com dados da literatura (35,114). A estabilidade da cinaropicrina em soluções aquosas foi analisada redissolvendo uma amostra do extrato obtido com diclorometano numa mistura de etanol:água 1:1 e deixada durante 2 horas a 25 $^{\circ}\text{C}$.

2.3.5. Quantificação da cinaropicrina por HPLC-DAD

2.3.5.1. Condições cromatográficas

A quantificação da cinaropicrina extraída a partir de folhas do cardo usando DES e soluções aquosas dos mesmos foi realizada recorrendo a um equipamento de cromatografia líquida de alta pressão, com detetor *diode array* (HPLC-DAD), da *Shimadzu*, do Modelo único PROMINENCE, equipado com um forno termostaticado e amostrador automático. Foi utilizada uma coluna *Reprosil C18*, 5 µm e com um diâmetro do poro de 100 Å (dimensões da coluna: 250 × 4,6 mm), da empresa *Maisch*. Os dados foram adquiridos e tratados com recurso ao *software labsolution*.

Como fase móvel foi utilizada uma mistura de 75 % de água pura e 25 % de acetonitrilo, com um fluxo de 0,5 mL/min. A temperatura da coluna manteve-se constante a 30 °C e os espectros UV foram registados a 198 nm. Uma alíquota de 200 µL de solução após a extração foi dissolvida em 800 µL de metanol. Todas as soluções padrão e amostras foram filtradas com um filtro de seringa de 0,20 µm. Após a filtração, foi injetado um volume de 10 µL, com um tempo de corrida na ordem dos 30 min.

2.3.5.2. Curva de calibração para quantificação da cinaropicrina por HPLC

A curva de calibração por HPLC para quantificação da cinaropicrina foi preparada com recurso a 12 soluções padrão, preparadas por diluição a partir de uma solução mãe do padrão de cinaropicrina em metanol, de concentração 4,09 mg/mL (Tabela 7). Cada padrão foi injetado em duplicado.

Tabela 8 - Preparação das soluções padrão.

Amostra	[Concentração] mg/mL
A – Solução Mãe	4,09
B	3,07
C	2,04
D	1,64
E	1,53
F	1,28
G	1,02
H	0,82
I	0,61
J	0,41
K	0,26
L	0,12

O tratamento dos dados obtidos com base na área dos picos cromatográficos permitiu obter a reta de regressão (Figura 16).

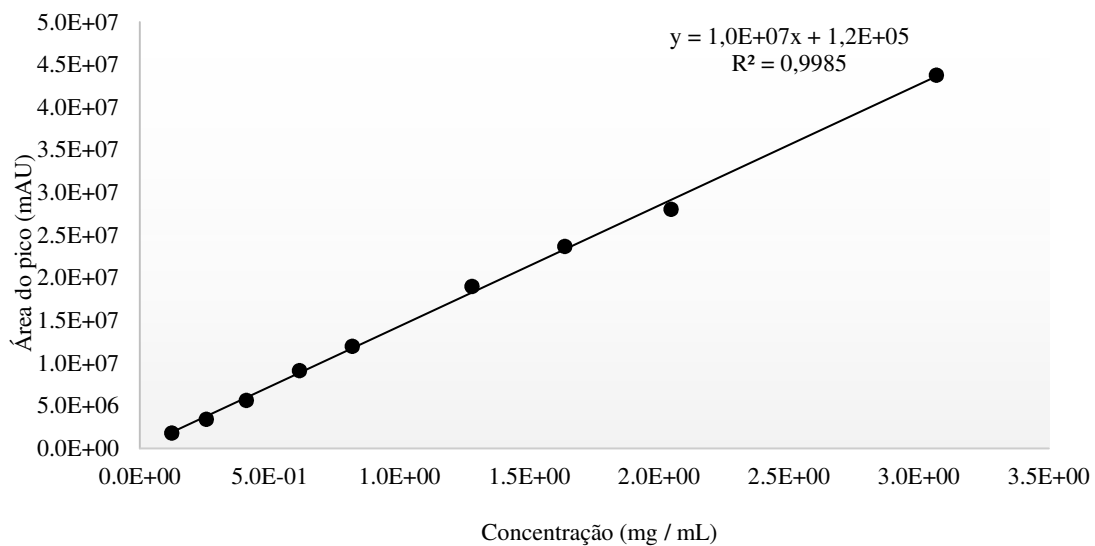


Figura 16 - Curva de calibração para a cinaropirina.

3. Resultados e Discussão

3.1. Formação dos DES

O estudo da formação de DES iniciou-se utilizando várias misturas de cloretos de colina como HBA e ácidos orgânicos carboxílicos (C_6 , C_{10} , C_{12}) como HBD. Com estas misturas não foi possível obter um líquido transparente e homogêneo e consequente formação do DES à temperatura ambiente. Assim, com base na literatura (100), e tendo em conta as características da cinaropicrina, consideraram-se como HBA o $[N_{4444}]Br$ e $[N_{4444}]Cl$, e ácido decanóico como HBD (100). Uma vez que estas duas misturas levaram à formação de um líquido transparente e homogêneo à temperatura ambiente, exploraram-se outras combinações utilizando 6 ácidos carboxílicos (ácidos butanóico, hexanóico, octanóico, decanóico, dodecanóico e tetradecanóico) como HBD, e $[N_{4444}]Br$ e $[N_{4444}]Cl$ como HBA, em três razões molares (2:1, 1:1, 1:2) (Tabela 6). De entre os vários DES formados verificou-se que a razão molar HBD:HBA de 2:1 proporciona, em quase todas as misturas, a formação de um DES líquido à temperatura ambiente.

3.1.1. Densidade e viscosidade dos DES puros

Os DES formados com o objetivo de substituir os solventes orgânicos na extração da cinaropicrina foram também caracterizados relativamente à sua densidade e viscosidade. A variação destes parâmetros em função da temperatura encontra-se representada nas Figuras 17 a 20. Analisando a Figura 17 e 18, é possível verificar que a densidade diminui com o aumento da temperatura para todos os DES. Por outro lado, mantendo a razão molar das misturas a densidade aumenta com a diminuição da cadeia carbonada dos vários ácidos utilizados. Esta tendência encontra-se de acordo com um estudo anterior acerca da densidade de vários ácidos orgânicos em função da temperatura, onde se registou uma relação linear entre o aumento da densidade e a diminuição da cadeia carbonada dos ácidos orgânicos (115). Apesar dos valores de densidade dos vários DES analisados não apresentarem diferenças significativas, as diferenças observadas podem ser explicadas com base na variação de densidade dos ácidos carboxílicos usados como HBD, já que o HBA foi mantido ($[N_{4444}]Br$ e $[N_{4444}]Cl$). De facto, embora estes ácidos tenham densidades próximas, verifica-se a mesma tendência de variação, sendo o ácido butanóico o que apresenta maior densidade, cerca de $959,50 \text{ kg.m}^{-3}$ (116).

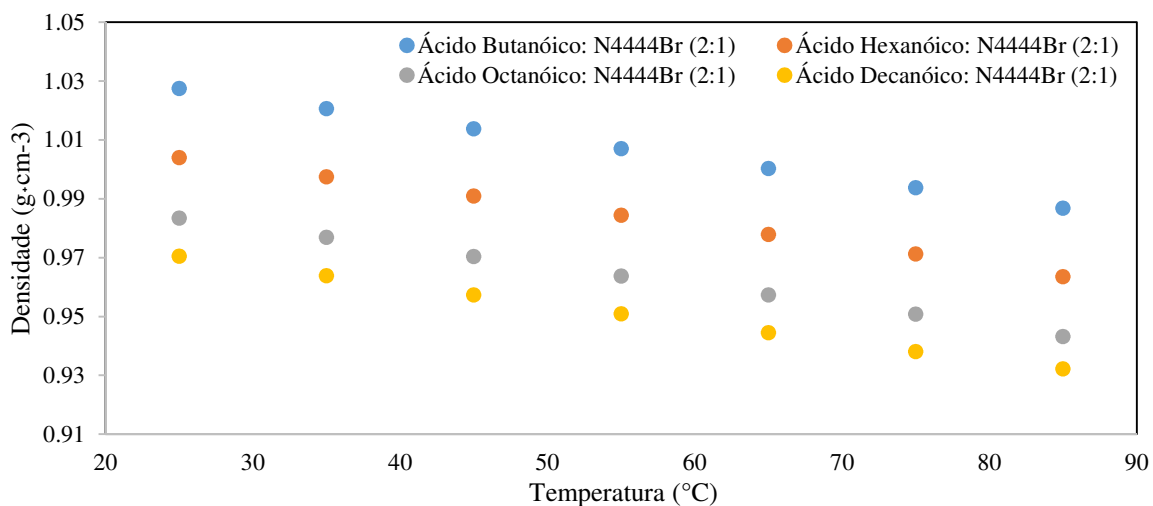


Figura 17 - Densidade dos DES obtidos em função da temperatura numa razão molar de 2:1, utilizando como HBA [N₄₄₄₄]Br e como HBD diferentes ácidos carboxílicos.

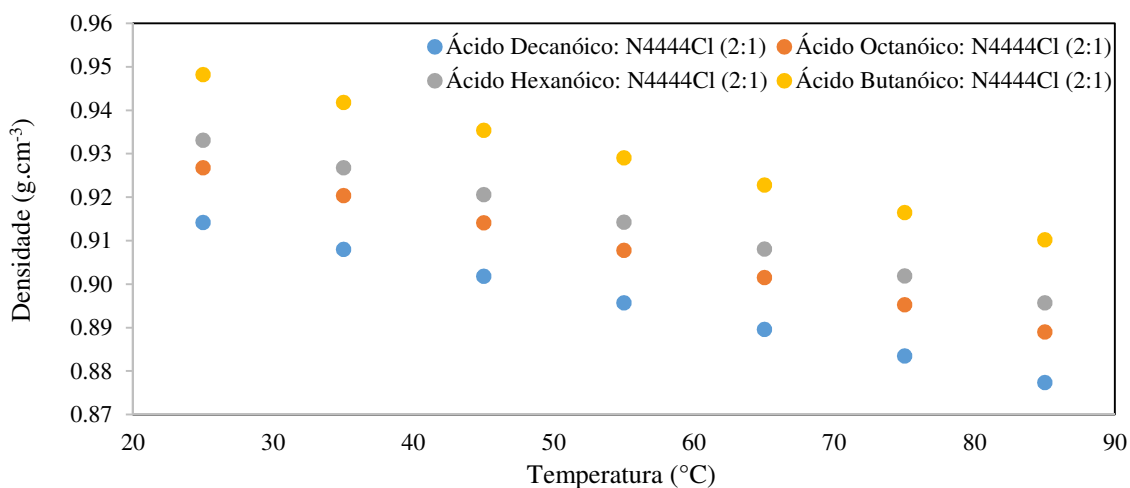


Figura 18 - Densidade dos DES obtidos em função da temperatura numa razão molar de 2:1, utilizando como HBA [N₄₄₄₄]Br e como HBD diferentes ácidos carboxílicos.

Por outro lado, os DES apresentam valores significativamente mais elevados de viscosidade do que a maioria dos solventes orgânicos e líquidos iônicos (117). Analisando a Figura 19 e 20, constata-se que a viscosidade dos DES diminui com temperatura e que à medida que a cadeia carbonada do ácido orgânico aumenta, a viscosidade também aumenta. Esta tendência encontra-se de acordo com um estudo prévio de vários parâmetros que afetam a viscosidade, onde se constatou que esta é influenciada pelo tamanho da cadeia carbonada dos ácidos orgânicos (118).

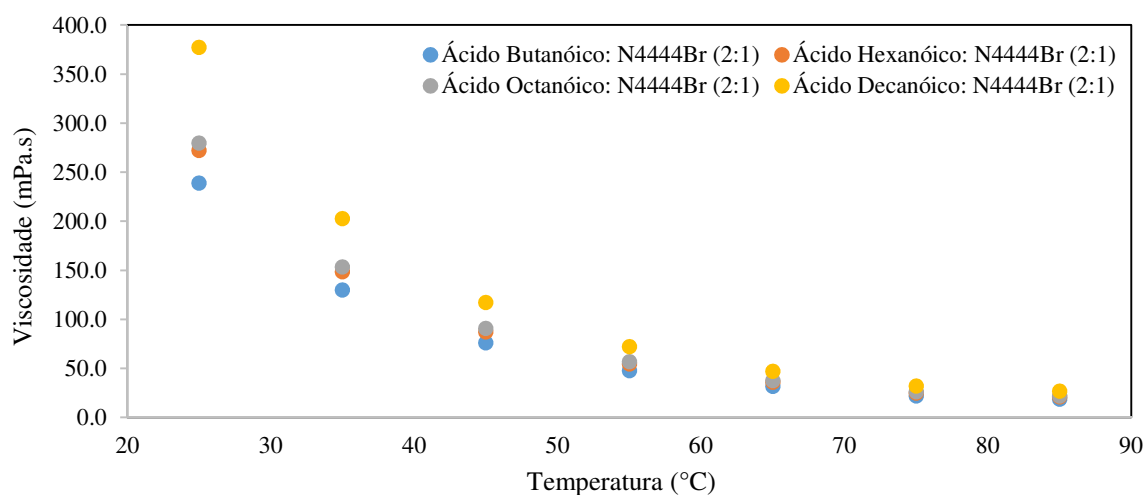


Figura 19 – Viscosidade dos DES obtidos em função da temperatura numa razão molar de 2:1, utilizando como HBA [N₄₄₄₄]Br e como HBD diferentes ácidos carboxílicos.

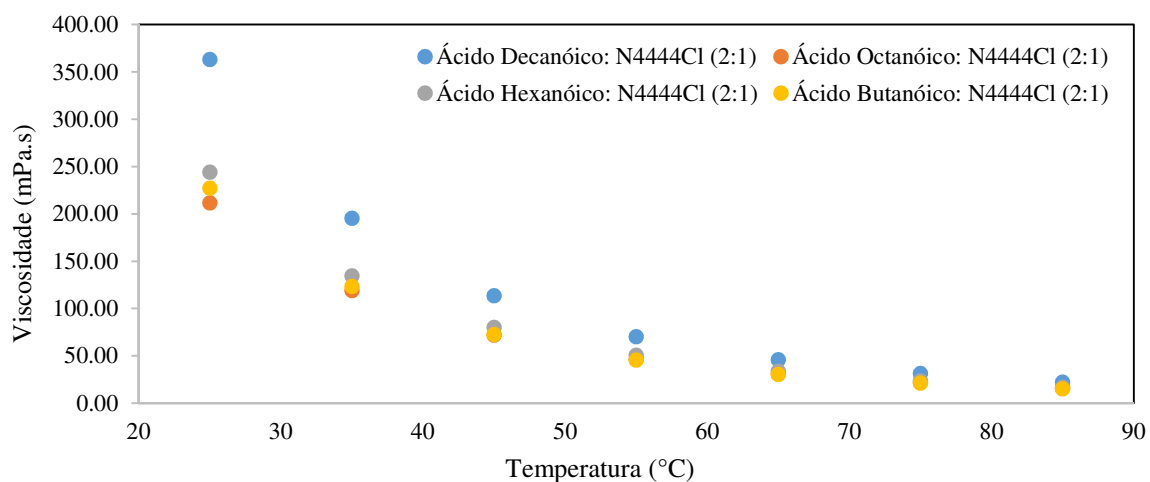


Figura 20 – Viscosidade dos DES obtidos em função da temperatura numa razão molar de 2:1, utilizando como HBA [N₄₄₄₄]Cl e como HBD diferentes ácidos carboxílicos.

Como supramencionado, a transferência de massa é favorecida para solventes com baixa viscosidade. Assim, comprovou-se a elevada viscosidade e densidade dos DES puros, sugerindo que soluções aquosas de DES podem ser mais promissoras. Os resultados determinados para os DES estudados indicam que a utilização de [N₄₄₄₄]Cl como HBA conduz a solventes com menor viscosidade e densidade, sugerindo assim uma extração mais eficiente da cinaropicrina ao invés da utilização de [N₄₄₄₄]Br. No entanto, a utilização de soluções aquosas de DES, na extração de cinaropicrina, pressupõe uma diminuição da viscosidade dos solventes, facilitando a transferência de massa. Como tal, neste trabalho, foram utilizados DES puros com [N₄₄₄₄]Cl como HBA majoritariamente, e soluções aquosas de DES ([N₄₄₄₄]Cl:ácidos orgânicos de cadeia alifática longa) na extração da cinaropicrina.

3.1.2. Parâmetros Solvatocrômicos

A literatura disponível sobre parâmetros solvatocrômicos de DES é muito reduzida, sendo inexistente para os DES utilizados neste trabalho (Tabela 6). Assim, de forma a aumentar o conhecimento sobre estes DES e retirar informação relevante para a seleção dos sistemas mais adequados para a extração da cinaropicrina, foram estudados os parâmetros solvatocrômicos de alguns DES utilizados neste trabalho, que se encontram apresentados na Tabela 8.

Tabela 9 - Parâmetros solvatocrômicos Kamlet-Taft de alguns DES utilizados neste trabalho determinados a 25 °C.

DES	α	β	π^*
Ác. Butanóico:[N ₄₄₄₄]Br (2:1)	3,49	0,89	0,89
Ác. Hexanóico:[N ₄₄₄₄]Br (2:1)	3,48	0,90	0,87
Ác. Octanóico:[N ₄₄₄₄]Br (2:1)	3,49	0,94	0,83
Ác. Decanóico:[N ₄₄₄₄]Br (2:1)	3,50	1,00	0,75
Ác. Hexanóico:[N ₄₄₄₄]Cl (2:1)	3,46	1,03	0,78
Ác. Hexanóico:[N ₃₃₃₃]Cl (2:1)	3,51	1,02	0,88
Ác. Hexanóico:[N ₂₂₂₂]Cl (2:1)	3,44	0,96	0,83
Solução aquosa (50 % água 50 % DES) Ác. Decanóico:[N ₄₄₄₄]Cl (2:1)	3,51	0,93	0,85

Os DES estudados apresentam um valor de α muito elevado quando comparados com outros solventes, como os solventes orgânicos e os líquidos iônicos, descritos na Tabela 5. Como supramencionado, o parâmetro α quantifica a capacidade de doar prótons em ligações por pontes de hidrogênio. Assim, como os DES analisados são constituídos por um ácido carboxílico como HBA (um forte dador de prótons), estes valores encontram-se dentro do esperado. Esta observação foi confirmada, determinando os parâmetros solvatocrômicos dos vários ácidos carboxílicos (líquidos à temperatura ambiente) utilizados nas formulações dos DES (Tabela 9).

Tabela 10 - Parâmetros solvatocrômicos Kamlet-Taft dos ácidos carboxílicos e água utilizados nas várias formulações dos DES determinados a 25 °C. Valor de (a) adaptado de (110).

Ácido	α	β	π^*
Ácido butanóico	4,41	2,47	-0,43
Ácido hexanóico	4,42	2,45	-0,44
Ácido octanóico	4,38	2,46	-0,48
Água	1,17 ^(a)	0,13	1,28

O valor de β dos DES selecionados (Ácidos carboxílicos:[N₄₄₄₄]Br na proporção molar de 2:1) aumenta com o aumento da cadeia carbonada dos ácidos orgânicos utilizados. No entanto, estes valores não apresentam variações significativas. No que respeita aos DES constituídos por ácido hexanóico (HBD) e [N₂₂₂₂]Cl, [N₃₃₃₃]Cl e [N₄₄₄₄]Cl (HBA), na proporção molar 2:1, o parâmetro β apresenta a tendência verificada anteriormente. Assim, o valor de β aumenta com o aumento da cadeia alifática dos DES estudados, sendo o DES constituído por ácido hexanóico:[N₄₄₄₄]Cl o que apresenta maior capacidade de aceitar prótons em ligações por pontes de hidrogénio.

O parâmetro π^* representa as interações não específicas ião-corante, polarizabilidade, interações dipolo-dipolo e dipolo-dipolo induzido. Analisando os valores obtidos constata-se que o DES baseado em ácido decanóico e [N₄₄₄₄]Br é o que apresenta um menor valor de π^* , o que se deve à sua cadeia alifática longa. A determinação dos parâmetros solvatocrômicos da solução aquosa de DES baseada em ácido decanóico e [N₄₄₄₄]Cl, com 50 % de água, permitiu verificar que a utilização de água nestes solventes não interfere significativamente com os seus parâmetros.

Os resultados dos parâmetros solvatocrômicos de Kamlet-Taft para os DES estudados indicam que a utilização de ácidos orgânicos de cadeia alifática longa como HBD apresentam menor polaridade, sugerindo assim o seu uso na extração da cinaropicrina. Assim, neste trabalho, foram utilizados DES com ácidos orgânicos de cadeia alifática longa como HBD, e [N₄₄₄₄]Br e [N₄₄₄₄]Cl como HBA na extração da cinaropicrina.

3.3. Extração da cinaropicrina a partir das folhas do cardo

3.3.1. Caracterização do extrato lipofílico de *C. cardunculus* L. por GC-MS

Esta parte do trabalho iniciou-se com a caracterização do extrato obtido com extração em Soxhlet com diclorometano da folha de *C. cardunculus*, que serve de referência para a avaliação e otimização do processo de extração com DES. As duas extrações Soxhlet efetuadas permitiram obter rendimentos de extração de 17,42 e 17,54 (m/m) %, valores concordantes com a literatura para amostras da mesma região: 17,3 (m/m) % (35,114).

A análise por GC-MS, após derivatização dos extratos obtidos, permitiu a identificação do composto de interesse neste trabalho, a cinaropicrina, assim como dos demais extratáveis com diclorometano às condições estudadas. Para tal, analisaram-se os cromatogramas obtidos por GC-MS (Figura 21), comparando-os com resultados anteriores do grupo de investigação (35,114). Assim e com base na caracterização detalhada deste extrato por Ramos *et al.* (35,114), em que a cinaropicrina foi inequivocamente identificada, a análise comparativa dos cromatogramas obtidos e dos respectivos espectros de massa dos derivados TMS, com os dados da literatura (35,114), confirmou a presença de cinaropicrina, com um tempo de retenção de 51,30 min.

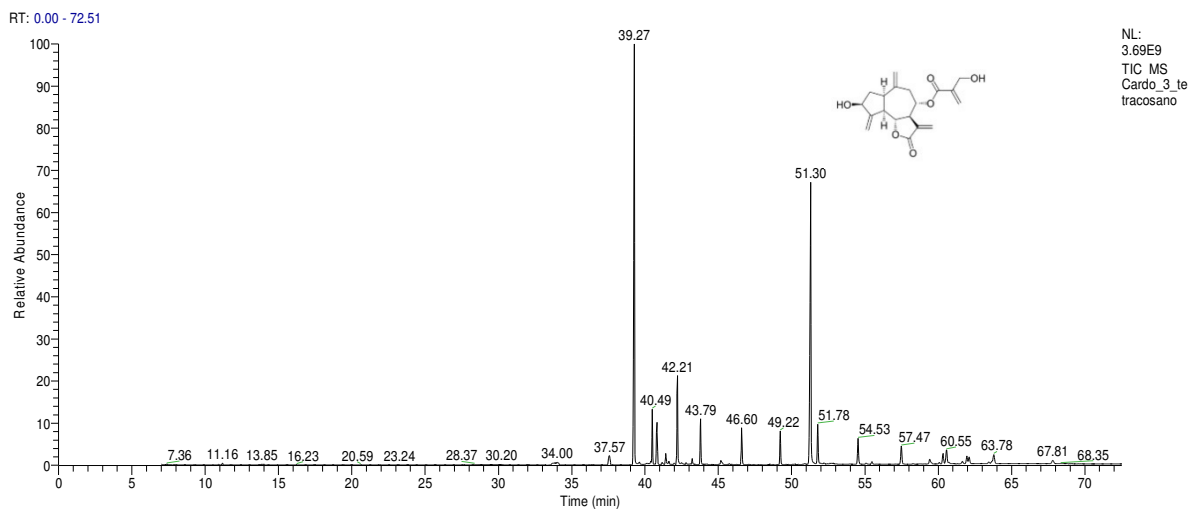


Figura 21 - Cromatograma de GC-MS do extrato em diclorometano das folhas de *C. cardunculus*.

Sendo a cinaropicrina um éster, confirmou-se a sua estabilidade em solução aquosa (utilizadas na extração com DES), verificando que a intensidade do pico correspondente à cinaropicrina não sofre qualquer alteração, pelo que em princípio o composto será estável em solução aquosa nas condições de temperatura e tempo usadas na extração com DES.

3.3.2. Caracterização do extrato lipofílico de *C. cardunculus L.* por HPLC-DAD

Embora quer o HPLC quer o GC-MS sejam usados na deteção e quantificação da cinaropicrina (35,62), considerando a natureza específica dos DES, a análise dos extratos por GC-MS exigiria diversos passos de pré-purificação da amostra (essencialmente para remoção do DES), o que não é necessário na análise por HPLC. Por este motivo, o HPLC-DAD foi selecionado como o método de quantificação de compostos bioativos extraídos com DES, e tal como já utilizado na literatura (91,106). De salientar que as amostras resultantes da extração por Soxhlet foram também analisadas por HPLC-DAD (Figura 22). O pico correspondente à cinaropicrina encontra-se destacado dos restantes, com um tempo de retenção de 27,62 min.

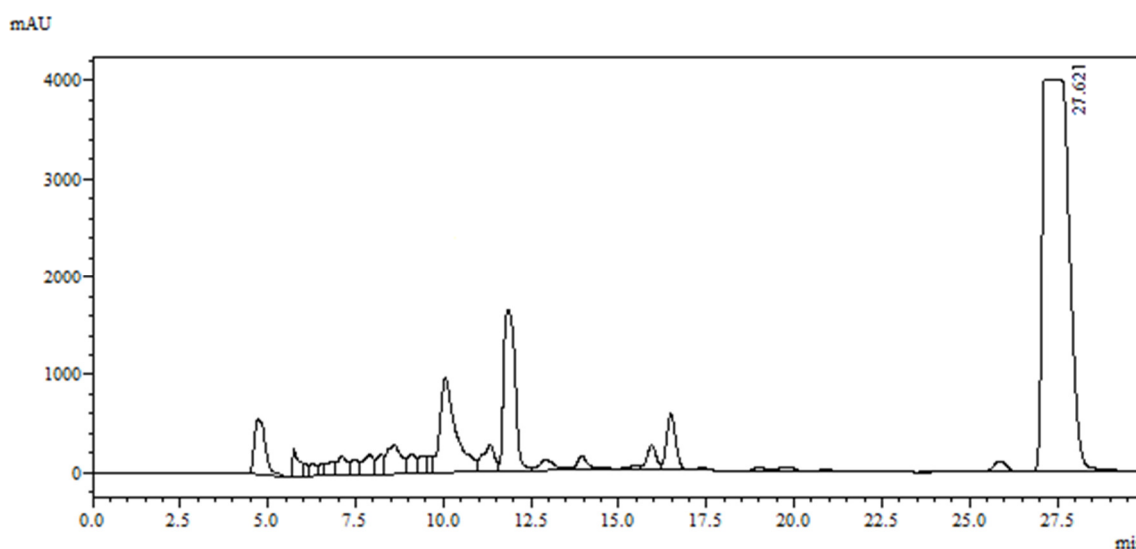


Figura 22 - Cromatograma de HPLC-DAD do extrato resultante da extração por Soxhlet com diclorometano das folhas do cardo.

3.3.3. Extração da cinaropicrina com DES

Na extração de cinaropicrina com DES selecionaram-se vários ácidos carboxílicos como HBD e vários sais de amónio quaternários como HBA. As condições iniciais de extração da cinaropicrina com DES incluíram: um tempo de extração de 2 horas a 25 °C, com uma $R_{S/L}$ de 1:10 sob agitação constante de 1000 rpm. Os rendimentos de extração (massa de cinaropicrina/massa de biomassa seca) %, (Figura 23), foram determinados com base na reta de calibração para quantificação da cinaropicrina descrita na Figura 16.

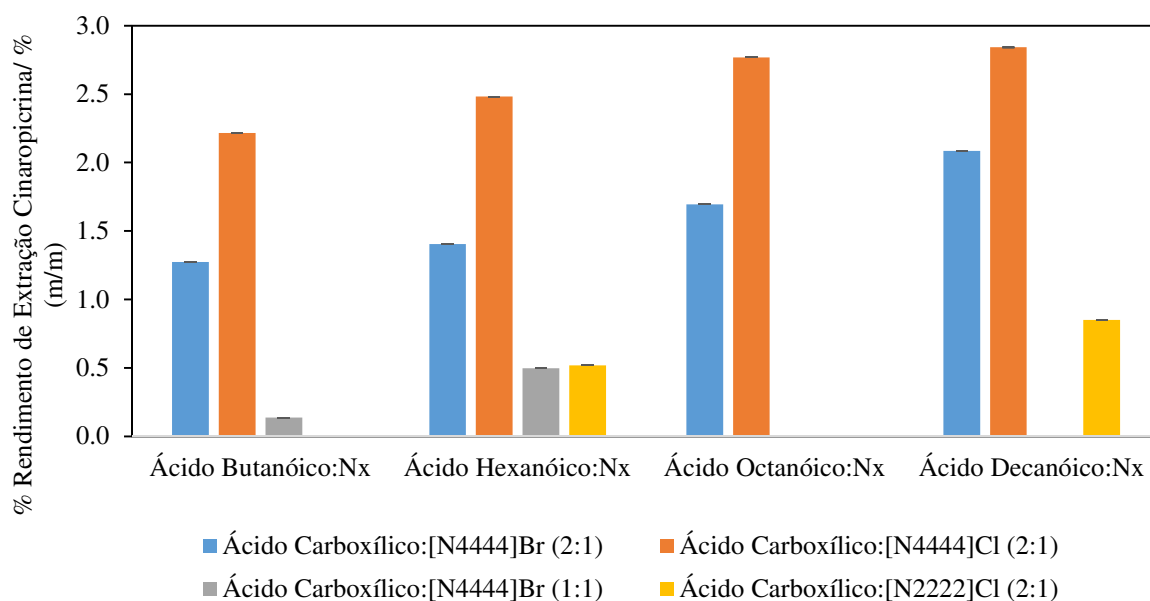


Figura 23 - Rendimentos de extração de cinaropicrina com vários DES, nas seguintes condições de extração: $R_{S/L}$ de 1:10; 2 horas e 25 °C.

Na Figura 23 verifica-se um aumento da eficiência de extração da cinaropicrina com o aumento da cadeia alquílica do ácido carboxílico do DES (HBD). Mantendo o HBA ([N₄₄₄₄]Cl ou [N₄₄₄₄]Br), e variando a cadeia alquílica dos ácidos carboxílicos, os DES derivados do ácido butanóico e decanóico (HBD) são os que exibem uma menor e maior eficiência de extração, respetivamente. Esta observação encontra-se concordante com a literatura (100). Dannie *et al.* (100) observaram que a eficiência de extração de ácidos gordos voláteis aumenta com o aumento do comprimento da cadeia do HBA, do HBD ou de ambos os componentes dos DES. Igualmente, neste trabalho, verifica-se uma diminuição da eficiência de extração menor com a utilização de [N₂₂₂₂]Cl como HBA.

Analisando a Figura 23, verifica-se que a capacidade extrativa do solvente aumenta significativamente, quando a proporção molar de HBD:HBA utilizada é 2:1, ao invés da proporção molar 1:1. O aumento da eficiência de extração, utilizando uma proporção molar de 2:1 de HBD:HBA, deve-se possivelmente à diminuição da viscosidade e da tensão superficial do solvente (106). Da literatura, foi também demonstrado que a proporção molar de HBD:HBA do DES influencia a capacidade extrativa de compostos bioativos (90).

A viabilidade do processo de extração da cinaropicrina com DES foi avaliada também realizando apenas a extração com os HBD constituintes dos DES utilizados. Assim, selecionaram-se os ácidos carboxílicos líquidos a 25 °C, nomeadamente os ácidos butanóico,

hexanóico e octanóico, comparando-se a eficiência de extração com os DES correspondentes (Figura 24).

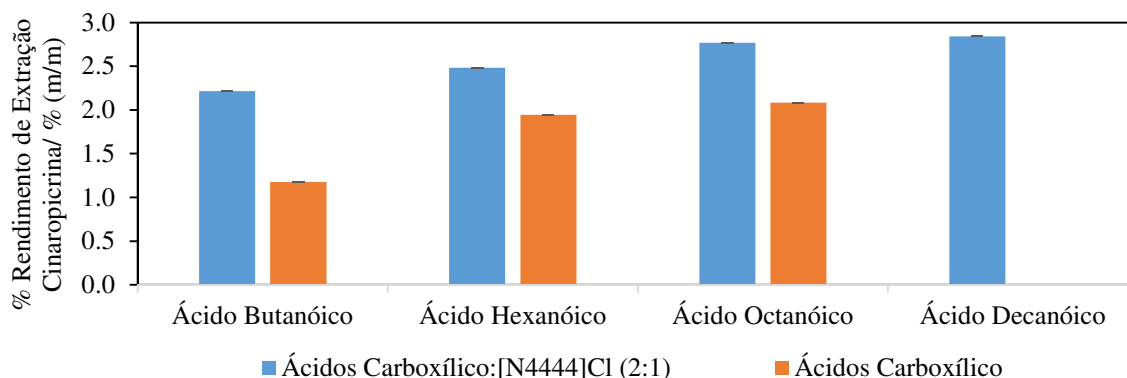


Figura 24 - Rendimentos de extração de cinaropicrina com DES (Ácidos carboxílicos: [N4444]Cl) e com os HBD destes solventes, nas seguintes condições de extração: $R_{S/L}$ de 1:10; 2 horas e 25 °C.

Verifica-se (Figura 24) que a eficiência de extração dos DES estudados é sempre superior ao correspondente HBD, pelo que se espera que para o DES mais eficiente (mistura de ácido decanóico:[N4444]Cl, na proporção de 2:1) se observe o mesmo fenómeno relativamente ao HBD correspondente (não testado por ser sólido à temperatura ambiente).

De forma a comparar os resultados da eficiência de extração com o DES que permitiu obter uma melhor eficiência de extração (Ácido decanóico:[N4444]Cl, na proporção molar de 2:1, Figura 23), esta foi comparada com a eficiência obtida com vários solventes orgânicos, nomeadamente, o n-hexano, a acetona, o diclorometano e a água nas mesmas condições de extração (Figura 25).

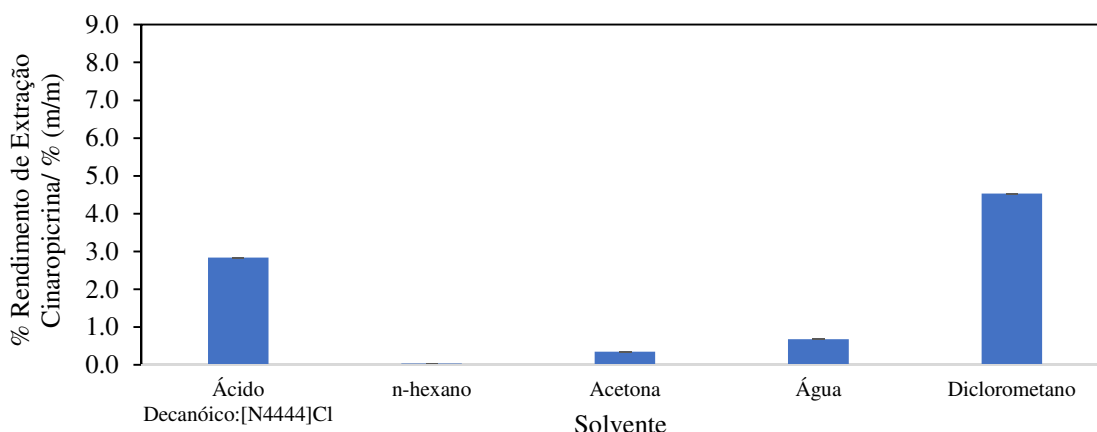


Figura 25 - Rendimentos de extração de cinaropicrina com DES e com solventes orgânicos e água pura nas seguintes condições de extração: $R_{S/L}$ de 1:10; 2 horas e 25 °C.

Verifica-se que apenas a extração com o diclorometano, nas mesmas condições de extração com DES), permite obter uma eficiência de extração superior (4,52 (m/m) %) à obtida com o melhor DES (2,84 (m/m) %), sendo que apesar de se perder em rendimento de extração, por outro lado, recorre-se à utilização de um solvente mais biocompatível.

3.3.3.1. Otimização das condições de extração da cinaropicrina com DES

A extração de cinaropicrina a partir do cardo com DES puros, nas condições iniciais de extração (Figura 23), permitiu uma eficiência de extração máxima de 2,84 (m/m) %. Na fase seguinte otimizaram-se as diferentes variáveis experimentais, nomeadamente o tempo e temperatura de extração, a $R_{S/L}$ e a quantidade de água no DES. Estas condições operacionais foram otimizadas utilizando o DES mais eficiente na extração da cinaropicrina (Ácido decanóico:[N₄₄₄₄]Cl, na proporção molar 2:1).

Inicialmente estudou-se a influência da temperatura (Figura 26) sob a eficiência de extração da cinaropicrina, mantendo as restantes condições ($R_{S/L}$ de 1:10; tempo de 2 horas).

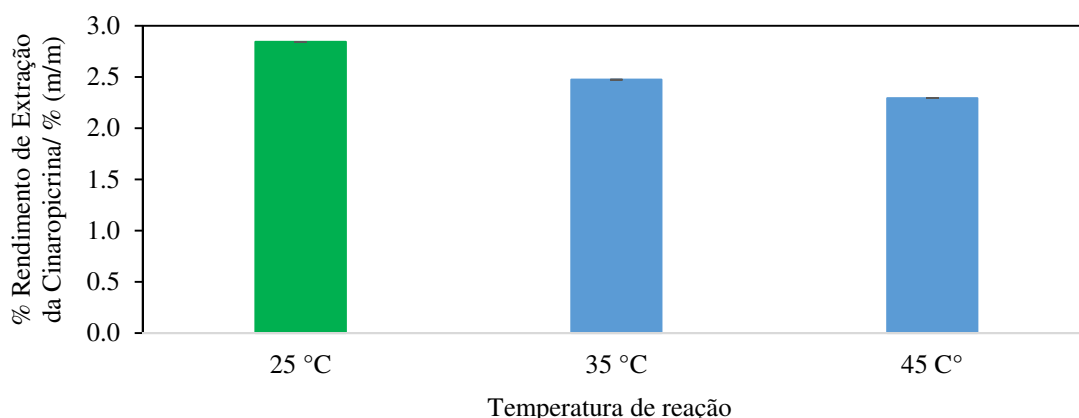


Figura 26 - Rendimentos de extração da cinaropicrina com ácido decanóico:[N₄₄₄₄]Cl, na proporção molar 2:1, variando a temperatura (25 °C, 35 °C e 45 °C).

Foi observada uma diminuição da eficiência de extração com o aumento da temperatura - Figura 26. O rendimento de extração máximo obtido foi de 2,84 (m/m) % a 25 °C. Antoaeta *et al.* (119) estudaram a extração de lactonas sesquiterpénicas a partir de *Inula helenium* L., verificando também uma redução dos rendimentos de extração de lactonas sesquiterpénicas com o aumento da temperatura (25 °C, 45 °C e 65 °C). Os menores rendimentos de extração a temperaturas mais elevadas podem ser explicados pela possibilidade de degradação térmica dos compostos em estudo (119). A temperatura de 25 °C foi então a seleccionada para os ensaios seguintes.

De seguida foi avaliada a influência do tempo de extração (Figura 27), mantendo constantes as restantes condições de extração.

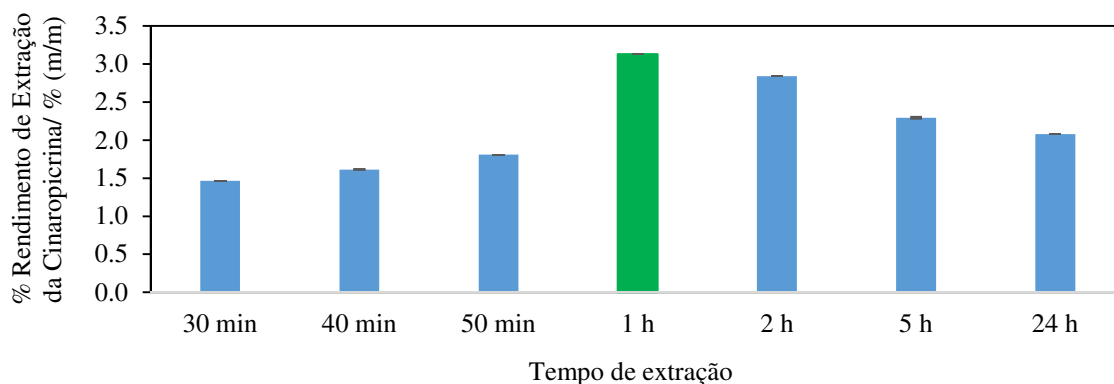


Figura 27 - Rendimentos de extração da cinaropicrina a partir do cardo com DES (ácido decanóico:[N4444]Cl, na proporção molar 2:1), variando o tempo de extração (30 min, 40 min, 50 min, 1 h, 2 h, 5 h e 24 h).

Observa-se um aumento da eficiência de extração desde os 30 min até 1 hora, atingindo um valor máximo de 3,13 (m/m) %. A partir de 1 hora, a eficiência de extração diminuiu gradualmente até às 24 horas. Esta tendência de passagem por um máximo na eficiência de extração ao longo do tempo foi também verificada por vários autores (103,107,119), quer na extração de diversos compostos bioativos a partir de fontes naturais utilizando DES (103,107), quer na extração de lactonas sesquiterpénicas utilizando etanol como solvente (119). Esta observação pode ser explicada pela degradação dos compostos de interesse provocada por uma exposição mais longa a ambientes químicos desfavoráveis (120). Assim, o decréscimo da eficiência com o tempo de extração deve-se possivelmente às mesmas razões que provocam o decréscimo do rendimento com a temperatura, sendo 1 hora o tempo de reação ótimo para a extração da cinaropicrina a partir das folhas do cardo com DES. Nos ensaios seguintes, o tempo de 1 hora foi selecionado, ao invés das 2 horas de extração utilizadas inicialmente.

No processo de extração, a razão sólido líquido $R_{S/L}$ é um parâmetro essencial uma vez que uma elevada quantidade de solvente está associada a processos complexos e com maior desperdício, e uma baixa quantidade de solvente pode levar a uma extração incompleta (106). As $R_{S/L}$ estudadas variaram de 1:10 até 1:50 (m/m) (Figura 28), mantendo as restantes condições operacionais otimizadas anteriormente.

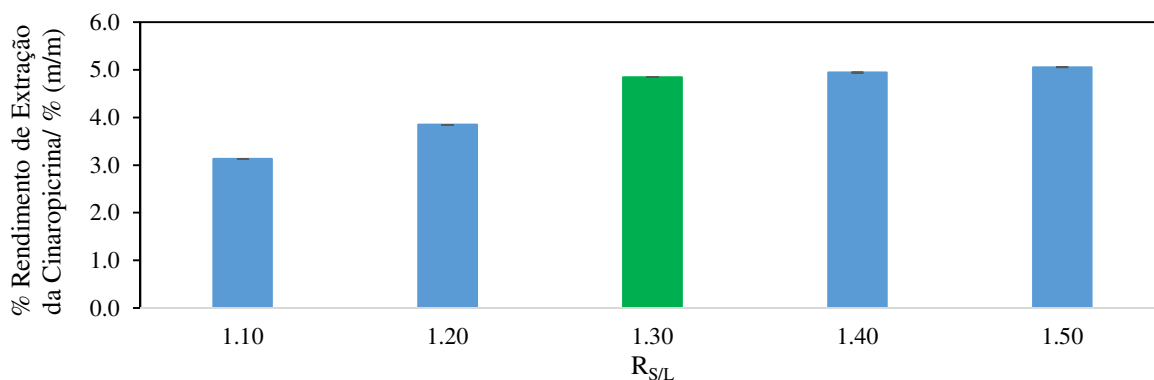


Figura 28 - Rendimentos de extração da cinaropicrina a partir do cardo com DES (ácido decanóico: [N₄₄₄₄]Cl, na proporção molar 2:1), variando a razão sólido-líquido (1:10; 1:20; 1:30; 1:40 e 1:50).

De um modo geral, o aumento do volume de solvente leva a um aumento do rendimento de extração do composto alvo (121), tal como verificado neste trabalho. Analisando a Figura 28, observa-se um aumento da eficiência de extração de cinaropicrina com o aumento da quantidade de solvente, atingindo um valor máximo de 5,05 (m/m) %. No entanto, entre as R_{S/L} de 1:30 e 1:50, as diferenças de eficiência de extração são menos significativas. Considerando as quantidades de solvente utilizadas e os custos associados, e que nas R_{S/L} 1:30 e 1:50 os rendimentos de extração obtidos são muito próximos (4,84 e 5,05 (m/m) %), respetivamente, considera-se que a R_{S/L} de 1:30 é globalmente a mais adequada. Wei *et al.* (88) também estudaram a eficiência de extração de compostos bioativos a partir de *Cajanus cajan* com DES, e verificaram que as eficiências de extração dos compostos alvo aumentou com o aumento da razão sólido-líquido (de 1:10 até 1:40).

A otimização do processo de extração visa a criação de processos mais económicos e ambientalmente benignos, mantendo a eficiência de extração elevada. Neste contexto, e à semelhança do já observado com as soluções aquosas de ILs (79), a utilização de soluções aquosas de DES pode apresentar benefícios significativos, diminuindo a viscosidade do solvente, e conseqüentemente diminuindo o custo da extração dos compostos alvo (106), desde que sejam mantidos rendimentos de extração aceitáveis. Assim, estudou-se a influência da percentagem de água (massa de água/massa de DES) no DES, na eficiência da extração da cinaropicrina. A percentagem de água variou desde os 5 % até os 100 %, mantendo as restantes condições otimizadas anteriormente: temperatura de 25 °C, tempo de extração de 1 hora, R_{S/L} de 1:30. Os resultados obtidos estão descritos na Figura 29.

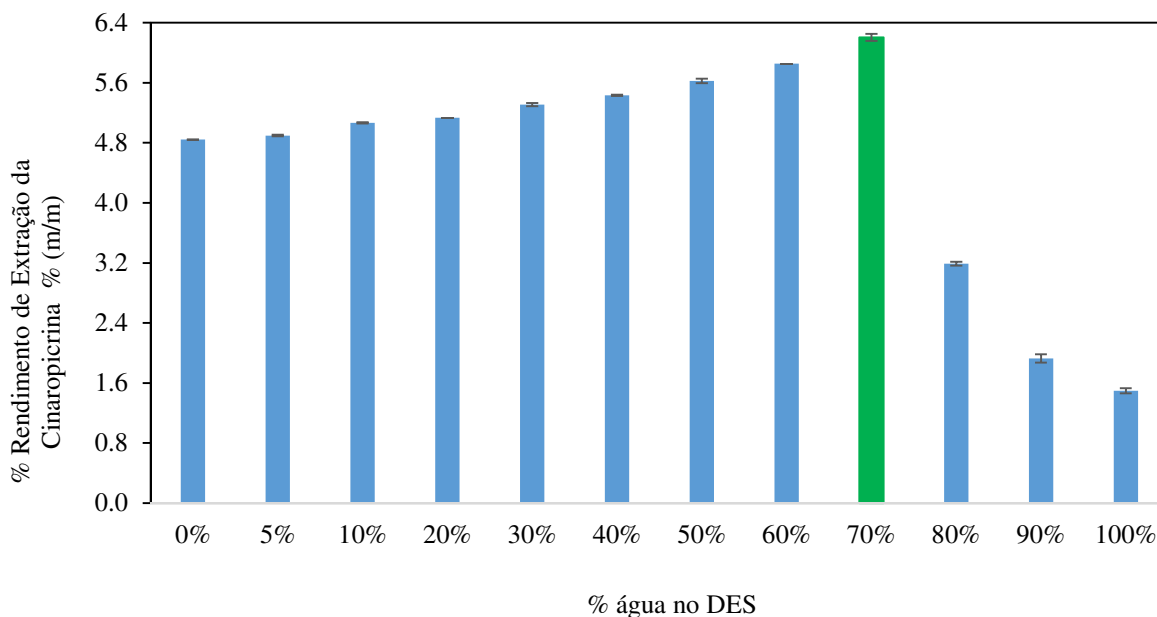


Figura 29 - Rendimentos de extração da cinaropicrina a partir do cardo com DES (ácido decanóico: [N₄₄₄₄]Cl, na proporção molar 2:1), na R_{SL} de 1:30, variando a percentagem de água no DES (entre 0 e 100 %)

Observou-se um aumento da eficiência de extração de cinaropicrina desde os 5 % até os 70 % de água no DES, atingindo um valor máximo de rendimento de extração de cinaropicrina de 6,2 (m/m) %; a partir de 70 % de água no DES a eficiência de extração diminuiu gradualmente (Figura 29). Este efeito será provavelmente devido à diminuição da viscosidade do solvente que permite uma melhor transferência de massa (105). Esta tendência de variação da eficiência de extração de compostos bioativos, passando por um máximo de quantidade de água, já foi verificada por vários autores (88,101,102,106). No entanto, todos estes autores demonstraram uma eficiência máxima de extração, ao utilizar apenas 20 % ou 30 % de água no DES, ao invés dos 70 % obtidos neste trabalho. Este resultado é bastante promissor tendo em conta que uma maior quantidade de água é favorável quer em termos de compatibilidade do solvente quer em termos económicos.

A otimização das condições de extração permitiu obter uma eficiência máxima de extração da cinaropicrina de 6,2 (m/m) % a partir das folhas do cardo utilizando DES. Esta eficiência máxima foi atingida a 25 °C durante 1 hora de extração, com a solução aquosa de DES (ácido decanóico: [N₄₄₄₄]Cl, na proporção molar 2:1, com 70 % de água), numa R_{SL} de 1:30. Assim, verifica-se que a extração de cinaropicrina com DES é um processo economicamente rentável uma vez que uma temperatura próxima da ambiente e apenas 1 hora de extração permitem obter a eficiência máxima de extração. Ambientalmente, o aumento da eficiência de extração com a utilização de soluções aquosas de DES, aumenta a

sustentabilidade do processo de extração. A utilização destes solventes permitiu também uma eficiência de extração de cinaropicrina superior a todos os solventes orgânicos estudados, com a mesma técnica de extração. No entanto, a extração por Soxhlet com diclorometano demonstrou uma capacidade extrativa superior aos DES (8,65 (m/m) %), apresentando bastantes desvantagens associadas, enumeradas anteriormente.

3.3.3.2. Reutilização dos solventes e biomassa

Com o intuito de desenvolver métodos de extração mais sustentáveis estudou-se a capacidade de reutilizar a mesma biomassa adicionando novas soluções de DES. Realizaram-se 6 ciclos sucessivos de extração com soluções aquosas de DES, nas condições operacionais de extração otimizadas anteriormente. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura 30.

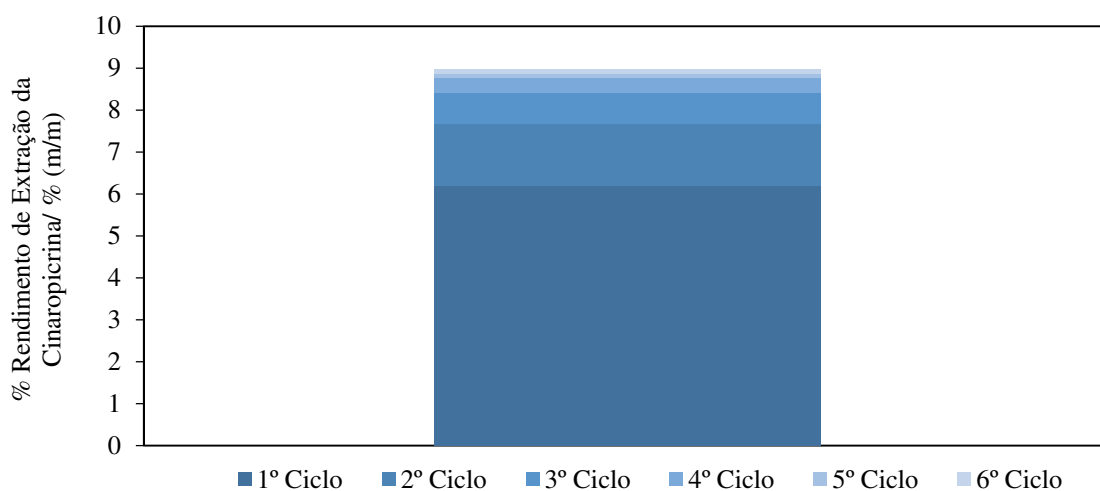


Figura 30 - Rendimentos de extração da cinaropicrina a partir do cardo com soluções aquosas de DES (ácido decanóico:[N4444]Cl, na proporção molar 2:1, com 70 % de água), realizando 6 ciclos de extração sucessivos, com reutilização da biomassa.

Analisando a Figura 30, verifica-se que a cinaropicrina presente na amostra não é totalmente extraída no primeiro passo, atingindo um rendimento máximo de 8,96 (m/m) % após 6 ciclos de extração. No entanto, após o 3º ciclo, a quantidade de cinaropicrina extraída passa a ser pouco significativa. De salientar que este valor máximo alcançado após as 6 extrações é mais elevado que o obtido por extração com Soxhlet com diclorometano obtido neste trabalho (8,65 (m/m) %).

A reutilização do solvente de extração apresenta benefícios económicos e ambientais significativos (122). Assim, estudou-se a capacidade de reutilização da solução aquosa de DES, adicionando nova biomassa, a cada ciclo de extração (Figura 31). Neste ensaio, realizaram-se 4 ciclos de sucessivos de extração, nas condições otimizadas, nomeadamente a $R_{S/L}$ de 1:30, a uma temperatura de 25 °C durante 1 hora.

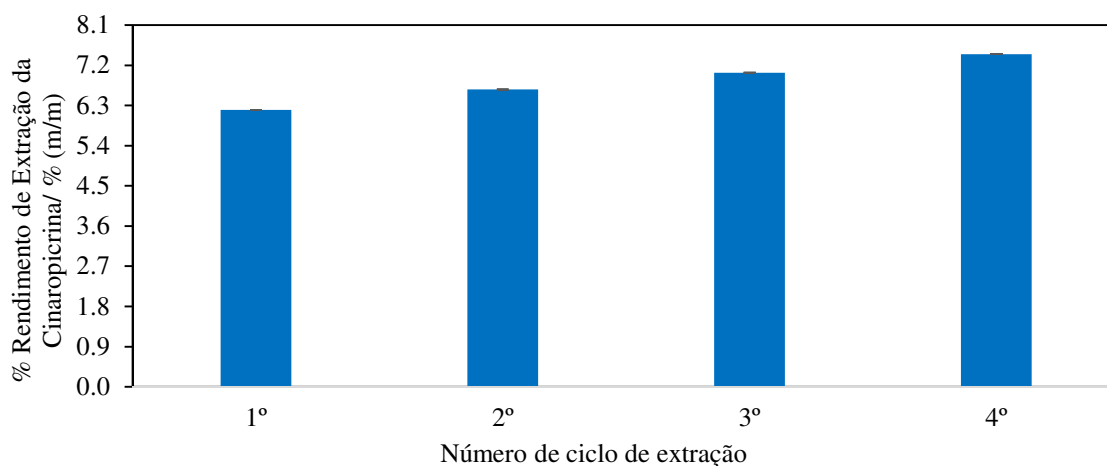


Figura 31 - Rendimentos de extração da cinaropicrina a partir do cardo com soluções aquosas de DES (ácido decanóico:[N4444]Cl, na proporção molar 2:1, com 70 % de água), realizando 4 ciclos de extração sucessivos, com reutilização do solvente.

O aumento do número de ciclos de extração com reutilização do solvente permitiu um aumento da eficiência de extração, atingido no 4º ciclo, até 7,45 (m/m) % de cinaropicrina. No entanto, o aumento do rendimento de extração após cada ciclo é pouco significativo indicando que o solvente se encontra próximo da saturação. Este resultado é concordante com vários estudos (122,123) que demonstraram a capacidade de reutilização do solvente, quer com DES (122) quer com líquidos iónicos (123), não perdendo a eficiência de extração.

3.3.1.3. Recuperação da cinaropicrina a partir das soluções aquosas de DES

A recuperação de cinaropicrina extraída com soluções aquosas de DES foi avaliada utilizando água como anti-solvente, tendo em consideração a baixa solubilidade da cinaropicrina em água (1,75 g / L de água a 20 °C) e o perfil de rendimento de extração em função da concentração de água em soluções aquosas de DES (Figura 29). Para tal, adicionaram-se volumes crescentes de água (5, 10, 15, 25 e 50 mL) a 0,5 mL de solução aquosa de DES após o 4º ciclo de extração do ensaio anterior, de modo a induzir a precipitação da cinaropicrina, e quantificando-se a sua quantidade residual em solução

(mg/mL) e após a precipitação como forma de determinar o rendimento de precipitação (m/m). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 10.

Tabela 11 - Concentração de cinaropícrina em mg por mL na solução aquosa de DES e cinaropícrina precipitada ((m/m) %) após a adição de diferentes volumes de água (5, 10, 15, 25 e 50 mL).

Volume de água adicionada	Cinaropícrina precipitada	
	(mg/mL)	(m/m) %
5 mL	0,145	38,3
10 mL	0,183	48,3
15 mL	0,199	52,5
25 mL	0,249	65,7
50 mL	0,279	73,6

Para a quantificação da cinaropícrina precipitada recorreu-se numa primeira fase à quantificação da cinaropícrina restante em solução após a adição de água (Tabela 10). Observa-se um aumento da precipitação desta com o aumento do volume de água adicionado. Globalmente este processo permite recuperar entre até 73.6% da cinaropícrina extraída com a solução aquosa de DES.

Após a filtração da solução à qual se adicionaram 5 mL de água, recuperou-se o precipitado (Figura 32), que foi seco e quantificado gravimetricamente, observando-se que o rendimento aumenta igualmente com o volume de água adicionada.

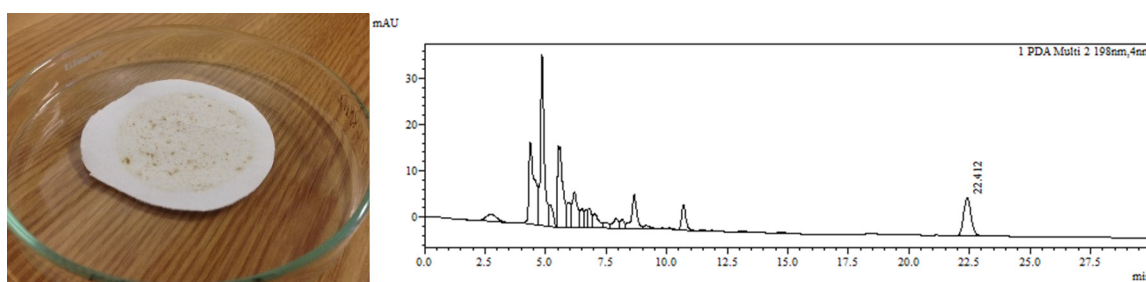


Figura 32 - Precipitado obtido após adição de água e Cromatograma de HPLC-DAD do precipitado obtido após dissolução em metanol.

No entanto, a análise por HPLC dos resíduos sólidos obtidos após dissolução em metanol, permitiu observar que estes extratos apresentam ainda uma composição relativamente complexa (Figura 32) evidenciando a co-precipitação de outros componentes da amostra, e em que a cinaropícrina representa apenas cerca de 10 % em massa.

Assim numa próxima etapas etapa será fundamental avaliar a natureza dos restantes compostos presentes neste precipitado e, a partir dai, considerando a elevada recuperação da cinaropictina avaliar a potencial utilização do extrato como tal, por exemplo em aplicações nutracêuticas ou necessário desenvolver estratégias que permitam obter a cinaropictina com níveis elevados de pureza.

4. Conclusão e Trabalho futuro

Neste trabalho, avaliou-se a utilização de DES como solventes alternativos na extração de biomoléculas de elevado valor comercial a partir de biomassa, nomeadamente a cinaropicrina a partir das folhas do cardo cultivado. As propriedades físicas e químicas destes solventes foram primeiramente avaliadas, visando o conhecimento das suas características e a otimização da eficiência de extração. Os resultados obtidos indicam que o tamanho da cadeia alifática do ácido orgânico utilizado como HBD no DES influencia a eficiência de extração. Assim, a utilização de ácidos orgânicos de cadeia alifática longa como HBD permitem a obtenção de eficiências de extração de cinaropicrina superiores, uma vez que apresentam uma menor polaridade. Dada a complexidade de combinações de HBD:HBA na formação de DES, verificou-se que a combinação de ácido decanóico: [N₄₄₄₄]Cl foi a mais seletiva e eficiente para a extração de cinaropicrina. Além disso, a utilização de soluções aquosas de DES permitiu uma extração mais eficiente da cinaropicrina que os DES puros e solventes orgânicos tradicionais. Foi também avaliada a reutilização do solvente e da biomassa visando o desenvolvimento de processos de extração mais sustentáveis. Nas condições otimizadas alcançou-se um rendimento de extração da cinaropicrina de 8,96 (m/m) %, que é superior ao obtido com solventes orgânicos voláteis nas mesmas condições. Também se avaliou a recuperação da cinaropicrina por adição de água às soluções aquosas de DES, permitindo um rendimento de recuperação de 73,6 (m/m) %. Em suma, os DES apresentam-se como uma alternativa interessante aos solventes orgânicos na extração de cinaropicrina a partir das folhas do cardo.

Como perspetiva futura, sendo a cinaropicrina um composto bioativo de alto valor comercial, torna-se essencial o desenvolvimento do método de recuperação e purificação do composto a uma escala piloto até à escala industrial. Por outro lado, apesar de os extratos obtidos se terem mostrado complexos, os restantes componentes presentes podem não ser impeditivos da sua utilização em aplicações nutracêuticas, ou serem até benéficos (124), permitindo a utilização direta daqueles extratos neste tipo de aplicações, pelo que esta abordagem deve ser objeto de estudo, no que concerne à avaliação da atividade biológica/propriedades nutricionais destes extratos.

Finalmente, e tendo em conta a referida complexidade dos extratos obtidos será igualmente fundamental desenvolver abordagens que permitam aumentar a seletividade de extração do processo desenvolvido, ou estratégias de purificação dos extratos.

5. Bibliografia

1. David B, Wolfender J-L, Dias DA. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochem Rev.* 2015;14(2):299–315.
2. Mishra BB, Tiwari VK. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *Eur J Med Chem.* 2011;46(10):4769–4807.
3. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years \pm . *J Nat Prod.* 2007;70(3):461–477.
4. Organization WH, others. WHO traditional medicine strategy 2002-2005. 2002
5. Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica Al.* 2000;33(2):179–189.
6. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, *et al.* Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng.* 2013;117(4):426–436.
7. Khoddami A, Wilkes M, Roberts T. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules.* 2013;18(3):2328–2375.
8. Raccuia SA, Mainolfi A, Mandolino G, Melilli MG. Genetic diversity in *Cynara cardunculus* revealed by AFLP markers: comparison between cultivars and wild types from Sicily*. *Plant Breed.* 2004;123(3):280–284.
9. Acquadro A, Portis E, Albertini E, Lanteri S. M-AFLP-based protocol for microsatellite loci isolation in *Cynara cardunculus* L. (Asteraceae): PRIMER NOTE. *Mol Ecol Notes.* 2005;5(2):272–274.
10. Sonnante G, Carluccio AV, Vilatersana R, Pignone D. On the origin of artichoke and cardoon from the *Cynara* gene pool as revealed by rDNA sequence variation. *Genet Resour Crop Evol.* 2007;54(3):483–495.
11. The Compositae Genome Project, <http://compgenomics.ucdavis.edu/>. Acedido em Outubro de 2015.
12. Ierna A, Mauromicale G. *Cynara cardunculus* L. genotypes as a crop for energy purposes in a Mediterranean environment. *Biomass Bioenergy.* 2010;34(5):754–760.
13. Gatto A, De Paola D, Bagnoli F, Vendramin GG, Sonnante G. Population structure of *Cynara cardunculus* complex and the origin of the conspecific crops artichoke and cardoon. *Ann Bot.* 2013;112(5):855–865.
14. Gominho J, Fernandez J, Pereira H. *Cynara cardunculus* L. — a new fibre crop for pulp and paper production. *Ind Crops Prod.* 2001;13(1):1–10.
15. Benlloch-González M, Fournier JM, Ramos J, Benlloch M. Strategies underlying salt tolerance in halophytes are present in *Cynara cardunculus*. *Plant Sci.* 2005;168(3):653–659.

16. Grammelis P, Malliopoulou A, Basinas P, Danalatos NG. Cultivation and Characterization of *Cynara Cardunculus* for Solid Biofuels Production in the Mediterranean Region. *Int J Mol Sci.* 2008;9(7):1241–1258.
17. Rial C, Novaes P, Varela RM, G. Molinillo JM, Macias FA. Phytotoxicity of Cardoon (*Cynara cardunculus*) Allelochemicals on Standard Target Species and Weeds. *J Agric Food Chem.* 2014;62(28):6699–6706.
18. Almeida CM, Gomes D, Faro C, Simões I. Engineering a cardosin B-derived rennet for sheep and goat cheese manufacture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99(1):269–281.
19. Valentão P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, Bastos ML. Antioxidative Properties of Cardoon (*Cynara cardunculus* L.) Infusion Against Superoxide Radical, Hydroxyl Radical, and Hypochlorous Acid. *J Agric Food Chem.* 2002;50(17):4989–4993.
20. Fernández J, Curt MD, Aguado PL. Industrial applications of *Cynara cardunculus* L. for energy and other uses. *Ind Crops Prod.* 2006;24(3):222–229.
21. Rottenberg A. The wild gene pool of globe artichoke. *Isr J Plant Sci.* 2015;62(1-2):33–38.
22. Fratianni F, Tucci M, Palma MD, Pepe R, Nazzaro F. Polyphenolic composition in different parts of some cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori). *Food Chem.* 2007;104(3):1282–1286.
23. Křižková L, Mučaji P, Nagy M, Krajčovič J. Triterpenoid cynarasaponins from *Cynara cardunculus* L. reduce chemically induced mutagenesis in vitro. *Phytomedicine.* 2004;11(7-8):673–678.
24. Gherbin P, Monteleone M, Tarantino E, others. Five Year Evaluation on Cardoon (*Cynara cardunculus* L. var. *altilis*) Biomass Production in Mediterranean Environment. *Ital J Agron.* 2001;5(1/2):11–20.
25. Curt MD, Sánchez G, Fernández J. The potential of *Cynara cardunculus* L. for seed oil production in a perennial cultivation system. *Biomass Bioenergy.* 2002;23(1):33–46.
26. Shatalov AA, Pereira H. Biorefinery of Energy Crop Cardoon (*Cynara cardunculus* L.)-Hydrolytic Xylose Production as Entry Point to Complex Fractionation Scheme. *J Chem Eng Process Technol.* 2012
27. Raccuia SA, Melilli MG. *Cynara cardunculus* L., a potential source of inulin in the Mediterranean environment: screening of genetic variability. *Aust J Agric Res.* 2004;55(6):693.
28. Gouveia SC, Castilho PC. Phenolic composition and antioxidant capacity of cultivated artichoke, Madeira cardoon and artichoke-based dietary supplements. *Food Res Int.* 2012;48(2):712–724.
29. Balandrin MF, Klocke JA, Wurtele ES, Bollinger WH. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science.* 1985;228(4704):1154–1160.
30. Fernandes MC, Ferro MD, Paulino AFC, Mendes JAS, Gravitis J, Evtuguin DV, *et al.* Enzymatic saccharification and bioethanol production from *Cynara cardunculus* pretreated by steam explosion. *Bioresour Technol.* 2015;186:309–315.

31. Pérez J, Muñoz-Dorado J, de la Rubia T, Martínez J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int Microbiol.* 2002;5(2):53–63.
32. Zhong R, Ye Z-H. Secondary cell walls: biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation. *Plant Cell Physiol.* 2014;pcu140.
33. Feldman D, Banu D, Natansohn A, Wang J. Structure–properties relations of thermally cured epoxy–lignin polyblends. *J Appl Polym Sci.* 1991;42(6):1537–1550.
34. Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Convers Manag.* 2011;52(2):858–875.
35. Ramos PAB, Guerra ÂR, Guerreiro O, Freire CSR, Silva AMS, Duarte MF, *et al.* Lipophilic Extracts of *Cynara cardunculus* L. var. *altilis* (DC): A Source of Valuable Bioactive Terpenic Compounds. *J Agric Food Chem.* 2013;61(35):8420–8429.
36. Wedge DE, Galindo JCG, Macias FA. Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs. *Phytochemistry.* 2000;53(7):747–757.
37. Canales M, Hernández T, Caballero J, Vivar AR de, Avila G, Duran A, *et al.* Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *J Ethnopharmacol.* 2005;97(3):429–439.
38. Rodriguez E, Towers GHN, Mitchell JC. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry.* 1976;15(11):1573–1580.
39. Chadwick M, Trewin H, Gawthrop F, Wagstaff C. Sesquiterpenoids Lactones: Benefits to Plants and People. *Int J Mol Sci.* 2013;14(6):12780–12805.
40. Neerman M. Sesquiterpene lactones: a diverse class of compounds found in essential oils possessing antibacterial and antifungal properties. *Int J Aromather.* 2003;13(2-3):114–120.
41. Seaman FC. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the asteraceae. *Bot Rev.* 1982;48(2):121–594.
42. Menin B, Comino C, Portis E, Moglia A, Cankar K, Bouwmeester HJ, *et al.* Genetic mapping and characterization of the globe artichoke (+)-germacrene A synthase gene, encoding the first dedicated enzyme for biosynthesis of the bitter sesquiterpene lactone cynaropicrin. *Plant Sci.* 2012;190:1–8.
43. Thiele K, Bernhard HO. Process for preparing bitter beverages. US4133903 A, 1979. Disponível em: <http://www.google.com/patents/US4133903>
44. Tanaka YT, Tanaka K, Kojima H, Hamada T, Masutani T, Tsuboi M, *et al.* Cynaropicrin from *Cynara scolymus* L. suppresses photoaging of skin by inhibiting the transcription activity of nuclear factor-kappa B. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013;23(2):518–523.
45. Cravotto G, Nano GM, Binello A, Spagliardi P, Seu G. Chemical and biological modification of cynaropicrin and grosheimin: a structure-bitterness relationship study. *J Sci Food Agric.* 2005;85(10):1757–1764.

46. Eljounaidi K, Comino C, Moglia A, Cankar K, Genre A, Hehn A, *et al.* Accumulation of cynaropicrin in globe artichoke and localization of enzymes involved in its biosynthesis. *Plant Sci.* 2015;239:128–136.
47. Schmidt TJ. Structure-Activity Relationships of Sesquiterpene Lactones. Em: *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier; 2006 p. 309–392.
48. Pandey MM, Rastogi S, Rawat AKS. *Saussurea costus*: Botanical, chemical and pharmacological review of an ayurvedic medicinal plant. *J Ethnopharmacol.* 2007;110(3):379–390.
49. Cho JY, Kim AR, Jung JH, Chun T, Rhee MH, Yoo ES. Cytotoxic and pro-apoptotic activities of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, on the viability of leukocyte cancer cell lines. *Eur J Pharmacol.* 2004;492(2-3):85–94.
50. Cho JY, Baik KU, Jung JH, Park MH. In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from *Saussurea lappa*. *Eur J Pharmacol.* 2000;398(3):399–407.
51. Emendörfer F, Emendörfer F, Bellato F, Noldin VF, Cechinel-Filho V, Yunes RA, *et al.* Antispasmodic activity of fractions and cynaropicrin from *Cynara scolymus* on guinea-pig ileum. *Biol Pharm Bull.* 2005;28(5):902–904.
52. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 2006;99(1):191–203.
53. Ramos PAB, Santos SAO, Guerra ÂR, Guerreiro O, Freire CSR, Rocha SM, *et al.* Phenolic composition and antioxidant activity of different morphological parts of *Cynara cardunculus* L. var. *altilis* (DC). *Ind Crops Prod.* 2014;61:460–471.
54. Extrasynthese, <http://www.extrasynthese.com/products-catalog/sesquiterpene/cynaropicrin-p7689406-c3808-s.html>. Acedido em Outubro de 2015.
55. Rostagno MA, editor. *Natural product extraction: principles and applications*. Cambridge: Royal Soc. of Chemistry; 2013. 500 p. (RSC green chemistry).
56. Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept’. *J Ethnopharmacol.* 2006;106(3):290–302.
57. Mitra S, editor. *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. Hoboken, NJ: Wiley; 2003. 458 p. (Chemical analysis).
58. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Latha LY. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants’ extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2011;8(1).
59. Brusotti G, Cesari I, Dentamaro A, Caccialanza G, Massolini G. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;87:218–228.
60. Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. International centre for science and high technology, Trieste, 2008, 21 – 25.

61. Sovová H, Opletal L, Sajfrtová M, Bártlová M. Supercritical fluid extraction of cynaropicrin and 20-hydroxyecdysone from *Leuzea carthamoides* DC. *J Sep Sci*. 2008;31(8):1387–1392.
62. Fritsche J, Beindorff C, Dachtler M, Zhang H, Lammers J. Isolation, characterization and determination of minor artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaf extract compounds. *Eur Food Res Technol*. 2002;215(2):149–157.
63. Kolli EH, León F, Benayache F, Estévez S, Quintana J, Estévez F, *et al*. Cytotoxic sesquiterpene lactones and other constituents of *Centaurea omphalotricha*. *J Braz Chem Soc*. 2012;23(5):977–983.
64. Chauhan A. GC-MS Technique and its Analytical Applications in Science and Technology. *J Anal Bioanal Tech*. 2014;5(6).
65. Bucar F, Wube A, Schmid M. Natural product isolation – how to get from biological material to pure compounds. *Nat Prod Rep*. 2013;30(4):525.
66. Heng MY, Tan SN, Yong JWH, Ong ES. Emerging green technologies for the chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *TrAC Trends Anal Chem*. 2013;50:1–10.
67. Grosso C, Valentão P, Ferreres F, Andrade P. Alternative and Efficient Extraction Methods for Marine-Derived Compounds. *Mar Drugs*. 2015;13(5):3182–3230.
68. Li C-J, Chen L. Organic chemistry in water. *Chem Soc Rev*. 2006;35(1):68–82.
69. Gu Y, Jérôme F. Glycerol as a sustainable solvent for green chemistry. *Green Chem*. 2010;12(7):1127.
70. Aparicio S, Alcalde R. The green solvent ethyl lactate: an experimental and theoretical characterization. *Green Chem*. 2009;11(1):65–78.
71. Brunner G. Applications of Supercritical Fluids. *Annu Rev Chem Biomol Eng*. 2010;1(1):321–342.
72. Earle MJ, Seddon KR. *Ionic Liquids: Green Solvents for the Future*. Ed: Abraham MA, Moens L, editores. *Clean Solvents*. Washington, DC: American Chemical Society; 2002. p. 10–25.
73. Rostagno MA, Villares A, Guillamón E, García-Lafuente A, Martínez JA. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *J Chromatogr A*. 2009;1216(1):2–29.
74. Kaufmann B, Christen P. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem Anal*. 2002;13(2):105–113.
75. da Silva RPF, Rocha-Santos TAP, Duarte AC. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *TrAC Trends Anal Chem*. 2016;76:40–51.
76. Zougagh M, Valcárcel M, Ríos A. Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness. *TrAC Trends Anal Chem*. 2004;23(5):399–405.
77. Solana M, Boschiero I, Dall'Acqua S, Bertucco A. Extraction of bioactive enriched fractions from *Eruca sativa* leaves by supercritical CO₂ technology using different co-solvents. *J Supercrit Fluids*. 2014;94:245–251.

78. Kim W-J, Kim J-D, Kim J, Oh S-G, Lee Y-W. Selective caffeine removal from green tea using supercritical carbon dioxide extraction. *J Food Eng.* 2008;89(3):303–309.
79. Passos H, Freire MG, Coutinho JAP. Ionic liquid solutions as extractive solvents for value-added compounds from biomass. *Green Chem.* 2014;16(12):4786–4815.
80. Tang B, Bi W, Tian M, Row KH. Application of ionic liquid for extraction and separation of bioactive compounds from plants. *J Chromatogr B.* 2012;904:1–21.
81. Freire MG, Teles ARR, Rocha MAA, Schröder B, Neves CMSS, Carvalho PJ, *et al.* Thermophysical Characterization of Ionic Liquids Able To Dissolve Biomass. *J Chem Eng Data.* 2011;56(12):4813–4822.
82. Abbott AP, Capper G, Davies DL, Rasheed RK, Tambyrajah V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. Electronic supplementary information (ESI). *Chem Commun.* 2003;(1):70–71.
83. Francisco M, van den Bruinhorst A, Kroon MC. Low-Transition-Temperature Mixtures (LTTMs): A New Generation of Designer Solvents. *Angew Chem Int Ed.* 2013;52(11):3074–3085.
84. Smith EL, Abbott AP, Ryder KS. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem Rev.* 2014;114(21):11060–11082.
85. Zeng Q, Wang Y, Huang Y, Ding X, Chen J, Xu K. Deep eutectic solvents as novel extraction media for protein partitioning. *The Analyst.* 2014;139(10):2565.
86. Zhang Q, De Oliveira Vigier K, Royer S, Jérôme F. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem Soc Rev.* 2012;41(21):7108.
87. Francisco M, van den Bruinhorst A, Kroon MC. New natural and renewable low transition temperature mixtures (LTTMs): screening as solvents for lignocellulosic biomass processing. *Green Chem.* 2012;14(8):2153.
88. Wei Z, Qi X, Li T, Luo M, Wang W, Zu Y, *et al.* Application of natural deep eutectic solvents for extraction and determination of phenolics in *Cajanus cajan* leaves by ultra performance liquid chromatography. *Sep Purif Technol.* 2015;149:237–244.
89. Ribeiro BD, Coelho MAZ, Marrucho IM. Extraction of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*) with cholinium-based ionic liquids and deep eutectic solvents. *Eur Food Res Technol.* 2013;237(6):965–975.
90. Tang B, Park HE, Row KH. Simultaneous Extraction of Flavonoids from *Chamaecyparis obtusa* Using Deep Eutectic Solvents as Additives of Conventional Extractions Solvents. *J Chromatogr Sci.* 2015;53(5):836–840.
91. Dai Y, Witkamp G-J, Verpoorte R, Choi YH. Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus tinctorius* L. *Anal Chem.* 2013;85(13):6272–6278.
92. Stepankova V, Vanacek P, Damborsky J, Chaloupkova R. Comparison of catalysis by haloalkane dehalogenases in aqueous solutions of deep eutectic and organic solvents. *Green Chem.* 2014;16(5):2754.

93. Zhang Y, Lü F, Cao X, Zhao J. Deep eutectic solvent supported TEMPO for oxidation of alcohols. *RSC Adv.* 2014;4(76):40161–40169.
94. Zaidi W, Boisset A, Jacquemin J, Timperman L, Anouti M. Deep Eutectic Solvents Based on *N*-Methylacetamide and a Lithium Salt as Electrolytes at Elevated Temperature for Activated Carbon-Based Supercapacitors. *J Phys Chem C.* 2014;118(8):4033–4042.
95. Sharma M, Mukesh C, Mondal D, Prasad K. Dissolution of α -chitin in deep eutectic solvents. *RSC Adv.* 2013;3(39):18149.
96. Oliveira FS, Pereiro AB, Rebelo LPN, Marrucho IM. Deep eutectic solvents as extraction media for azeotropic mixtures. *Green Chem.* 2013;15(5):1326.
97. Carranza A, Pojman JA, Mota-Morales JD. Deep-eutectic solvents as a support in the nonaqueous synthesis of macroporous poly(HIPEs). *RSC Adv.* 2014;4(78):41584–41597.
98. Morrison HG, Sun CC, Neervannan S. Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles. *Int J Pharm.* 2009;378(1-2):136–139.
99. Shahbaz K, Mjalli FS, Hashim MA, ALNashef IM. Using Deep Eutectic Solvents for the Removal of Glycerol from Palm Oil-Based Biodiesel. *J Appl Sci.* 2010;10(24):3349–3354.
100. van Osch DJGP, Zubeir LF, van den Bruinhorst A, Rocha MAA, Kroon MC. Hydrophobic deep eutectic solvents as water-immiscible extractants. *Green Chem.* 2015;17(9):4518–4521.
101. Bi W, Tian M, Row KH. Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. *J Chromatogr A.* 2013;1285:22–30.
102. Yao X-H, Zhang D-Y, Duan M-H, Cui Q, Xu W-J, Luo M, *et al.* Preparation and determination of phenolic compounds from *Pyrola incarnata* Fisch. with a green polyols based-deep eutectic solvent. *Sep Purif Technol.* 2015;149:116–123.
103. Tang B, Bi W, Zhang H, Row KH. Deep Eutectic Solvent-Based HS-SME Coupled with GC for the Analysis of Bioactive Terpenoids in *Chamaecyparis obtusa* Leaves. *Chromatographia.* 2014;77(3-4):373–377.
104. Nam MW, Zhao J, Lee MS, Jeong JH, Lee J. Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: application to flavonoid extraction from *Flos sophorae*. *Green Chem.* 2015;17(3):1718–1727.
105. Wei Z-F, Wang X-Q, Peng X, Wang W, Zhao C-J, Zu Y-G, *et al.* Fast and green extraction and separation of main bioactive flavonoids from *Radix Scutellariae*. *Ind Crops Prod.* 2015;63:175–181.
106. Qi X-L, Peng X, Huang Y-Y, Li L, Wei Z-F, Zu Y-G, *et al.* Green and efficient extraction of bioactive flavonoids from *Equisetum palustre* L. by deep eutectic solvents-based negative pressure cavitation method combined with macroporous resin enrichment. *Ind Crops Prod.* 2015;70:142–148.

107. Park HE, Tang B, Row KH. Application of Deep Eutectic Solvents as Additives in Ultrasonic Extraction of Two Phenolic Acids from *Herba Artemisiae Scopariae*. *Anal Lett.* 2014;47(9):1476–1484.
108. Jessop PG, Jessop DA, Fu D, Phan L. Solvatochromic parameters for solvents of interest in green chemistry. *Green Chem.* 2012;14(5):1245.
109. Laurence C, Nicolet P, Dalati MT, Abboud J-LM, Notario R. The Empirical Treatment of Solvent-Solute Interactions: 15 Years of .pi.*. *J Phys Chem.* 1994;98(23):5807–5816.
110. Harris RC. *Physical Properties of Alcohol Based Deep Eutectic Solvents.* [Leicester, USA]: University of Leicester; 2008.
111. Kamlet MJ, Abboud JLM, Abraham MH, Taft RW. Linear solvation energy relationships. 23. A comprehensive collection of the solvatochromic parameters, .pi.*, .alpha., and .beta., and some methods for simplifying the generalized solvatochromic equation. *J Org Chem.* 1983;48(17):2877–2887.
112. Freire CSR, Silvestre AJD, Neto CP. Identification of New Hydroxy Fatty Acids and Ferulic Acid Esters in the Wood of *Eucalyptus globulus*. *Holzforschung.* 2002;56(2).
113. Cláudio AFM, Neves MC, Shimizu K, Canongia Lopes JN, Freire MG, Coutinho JAP. The magic of aqueous solutions of ionic liquids: ionic liquids as a powerful class of cationic hydrotropes. *Green Chem.* 2015;17(7):3948–3963.
114. Patrícia A. B. Ramos. *Chemical characterization and evaluation of biological activity of Cynara cardunculus extractable compounds.* University of Aveiro; 2015.
115. Bernardo-Gil G, Esquivel M, Ribeiro A. Densities and refractive indices of pure organic acids as a function of temperature. *J Chem Eng Data.* 1990;35(2):202–204.
116. Pubchem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acedido em Novembro 2015.
117. Ruß C, König B. Low melting mixtures in organic synthesis – an alternative to ionic liquids? *Green Chem.* 2012;14(11):2969.
118. El-hefian, E. A., Khan., A. R., and Hamid Yahaya, A. (2008) Study of the parameters affecting the viscosity of chitosan solution. *J. Chem. Soc. Pak.*
119. Trendafilova A, Chanev C, Todorova M. Ultrasound-assisted extraction of alantolactone and isoalantolactone from *Inula helenium* roots. *Pharmacogn Mag.* 2010;6(23):234.
120. Tan MC, Tan CP, Ho CW. Effects of extraction solvent system, time and temperature on total phenolic content of henna (*Lawsonia inermis*) stems. *Int Food Res J.* 2013;20(6):3117–3123.
121. Wang L, Weller CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Technol.* 2006;17(6):300–312.
122. Hadj-Kali MK, Mulyono S, Hizaddin HF, Wazeer I, El-Blidi L, Ali E, *et al.* Removal of Thiophene from Mixtures with *n*-Heptane by Selective Extraction Using Deep Eutectic Solvents. *Ind Eng Chem Res.* 2016

123. Cláudio AFM, Ferreira AM, Freire MG, Coutinho JAP. Enhanced extraction of caffeine from guaraná seeds using aqueous solutions of ionic liquids. *Green Chem.* 2013;15(7):2002.
124. Naturex, <http://www.naturex.com/>. Acedido em Maio de 2016.

