



**Universidade de Aveiro** Departamento de Química  
2016

**Melissa Vieira Gomes**

**Nº Mec. 65382**

**Extração e recuperação de cinaropicrina a partir de *Cynara cardunculus* L. usando soluções aquosas de líquidos iónicos**

**Extraction and recovery of cynaropicrin from *Cynara cardunculus* L. using ionic liquids aqueous solutions**





**Universidade de Aveiro** Departamento de Química  
2016

**Melissa Vieira Gomes**

**Nº Mec. 65382**

**Extração e recuperação de cinaropicrina a partir de *Cynara cardunculus* L. usando soluções aquosas de líquidos iónicos**

**Extraction and recovery of cynaropicrin from *Cynara cardunculus* L. using ionic liquids aqueous solutions**

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



*A minha mãe, irmã e  
amigos...*



## **O júri**

Presidente

Prof. Doutor João Manuel da Costa Araújo Pereira Coutinho  
da Silva

Professor Catedrático do Departamento de Química, da Universidade de  
Aveiro

Doutora Mara Guadalupe Freire Martins

Investigadora Coordenadora do Departamento de Química, CICECO, da  
Universidade de Aveiro

Doutora Ana Filipa Martins Cláudio da Silva

Assistente Técnica de Desenvolvimento e Qualidade de Produtos, The  
Navigator Company



## Agradecimentos

É com grande alegria que atinjo mais uma meta do meu percurso da minha vida profissional e realização pessoal. Claro que tudo isto não teria sido possível sem a contribuição de algumas pessoas que passo a citar.

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus orientadores Doutora Mara Freire e Doutor Armando Silvestre pela dedicação, orientação científica imprescindível para a realização deste trabalho e pela confiança que depositaram em mim.

Gostaria também de realçar a paciência e a disponibilidade incondicional da Doutora Ana Filipa Cláudio e da Emanuelle Pache que me ajudaram imenso na realização deste trabalho.

Agradeço a todos os membros do Path e mini Path, por me terem ajudado quando eu precisei, por serem pessoas tão bem dispostas a tirar as minhas dúvidas e pela maneira como me integraram neste grupo.

A execução deste trabalho permitiu-me abrir horizontes na área da investigação, e mostrou-me que por vezes as coisas não correm como nós queremos ou planeamos. Contudo, quando não desistimos encontramos outras soluções, o que torna o trabalho mais enriquecedor e ao mesmo tempo ficamos orgulhosos de nós próprios por ter conseguido ultrapassar uma barreira que parecia intransponível.

Por fim, quero salientar a importância da minha mãe, da minha irmã e dos meus amigos neste percurso. Vocês são a inspiração para alcançar os meus sonhos e vontade para continuar a minha caminhada de aprendizagem a todos os níveis, pessoal e profissional.



## Palavras-chave

Cardo, *Cynara cardunculus* L., cinaropicrina, propriedades anti-tumorais, extração, solução aquosa, líquidos iônicos, recuperação.

## Resumo

O desenvolvimento de estratégias sustentáveis para a extração e recuperação de compostos naturais de valor acrescentado a partir de biomassa é um requisito fundamental para a sua valorização. A cinaropicrina, um dos componentes principais do *Cynara cardunculus* L. (cardo), exibe uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo anti-inflamatórias e anti-tumorais, sendo assim considerado de grande interesse.

Com o objetivo de evitar o uso de solventes orgânicos voláteis, neste trabalho estudaram-se soluções aquosas de líquidos iônicos (LIs) para a extração da cinaropicrina do *Cynara cardunculus* L. (cardo). Os LIs estudados envolvem cloretos de imidazólio e alcanoatos de colínio. Estudaram-se também soluções aquosas de surfactantes convencionais para avaliar o seu desempenho face às soluções de LIs. As condições operacionais estudadas para otimizar a extração da cinaropicrina incluem a concentração, a razão sólido/líquido (biomassa/solvente), o tempo de extração e a temperatura.

O rendimento de extração máximo da cinaropicrina, com soluções aquosas de LIs foi de 4,09 m/m%, com a concentração a 500mM, temperatura igual a 25°C, durante 1h e com  $R_{(S/L)}=1:40$ . Este valor é próximo do obtido com diclorometano (4,53 m/m%).

Assim, a utilização de soluções aquosas de LIs para a extração da cinaropicrina a partir da folha do cardo representa uma alternativa relevante para reduzir o impacto ambiental dos processos de extração deste composto e melhorar a sua sustentabilidade.



**Keywords**

Cardoon, *Cynara cardunculus* L., cynaropicrin, antitumor properties, extraction, aqueous solutions, ionic liquids, recovery.

**Abstract**

The development of sustainable strategies for the extraction and recovery of increased-value natural compounds from biomass is a crucial requirement for the valorization. The cynaropicrin, one of the main components present in *Cynara cardunculus* L. (cardoon), displays a wide range of biological activities, including anti-inflammatory and antitumor, and therefore considered of great interest.

Aiming at avoiding the use of volatile organic solvents, in this work, aqueous solutions of ionic liquids (ILs) were investigated. The ILs studied comprise imazolium chlorides and cholinium alkanoates. Aqueous solutions of conventional surfactants were also prepared and used to compare with the performance of ILs for the extraction of cynaropicrin. The operating conditions evaluated to increase the extraction yield of cinaropicrin include the concentration, the solid/liquid (biomass/solvent) ratio, extraction time and temperature.

The maximum extraction yield of cinaropicrin with aqueous solutions of ILs was 4.09% w/w, with concentration of 500mM, at 25°C for 1h and with  $R_{(S/L)}=1:40$ . The value is near to the one obtained with dichloromethane, namely 4.53% w/w. Therefore, the use of ILs aqueous solutions for the extraction of cynaropicrin from cardoon leaf represents a relevant alternative to reduce the environmental impact of extraction methods of this compounds and to improve their sustainability.



# Índice

Lista de figuras.....	XV
Lista de tabelas.....	XVII
Lista de abreviaturas .....	XIX
Lista de líquidos iônicos .....	XXI
<b>1 - Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1 - Considerações gerais sobre <i>Cynara cardunculus</i> L. ....	3
1.1.1 - Taxonomia e distribuição geográfica.....	3
1.1.2 - Características morfológicas do cardo.....	4
1.2 - Aplicações de <i>C. cardunculus</i> L.....	4
1.3 - Composição química da <i>C. cardunculus</i> L.....	5
1.4 - Atividade biológica da cinaropicrina.....	7
1.5 - Extração de compostos bioativos a partir da biomassa .....	8
1.6 - Líquidos iônicos como solventes alternativos .....	10
1.7 - Extração e isolamento de compostos de valor acrescentado a partir da biomassa utilizando líquidos iônicos .....	12
1.7.1 - Caracterização dos LIs: Parâmetros solvatocrômicos.....	14
1.8 - Objetivos.....	17
<b>2 - Materiais e métodos .....</b>	<b>19</b>
2.1 - Amostras e reagentes .....	21
2.1.1 - Amostras .....	21
2.1.2 - Reagentes .....	21
2.2 - Análise da composição química do extrato lipofílico das folhas de <i>C. cardunculus</i> L. ....	22
2.3 - Quantificação da cinaropicrina por HPLC .....	23
2.3.1 - Condições cromatográficas .....	23
2.3.2 - Curva de calibração para quantificação da cinaropicrina .....	23
2.4 - Síntese de alcenoatos de colínio .....	25
2.5 - Determinação da concentração micelar crítica dos alcenoatos de colínio.....	25
2.6 - Medição dos parâmetros solvatocrômicos das soluções aquosas de LIs.....	25
2.7 - Extração da cinaropicrina das folhas de <i>Cynara cardunculus</i> L. com soluções aquosas de LIs, surfactantes e solventes convencionais .....	26
<b>3 - Resultados e discussão .....</b>	<b>29</b>

3.1 - Caracterização do extrato lipofílico das folhas de <i>C. cardunculus</i> L. por GC-MS .....	31
3.2 - Quantificação da cinaropicrina por HPLC no extrato em diclorometano .....	32
3.3 - Determinação das Concentração Micelar Crítica (CMC) dos alcenoatos de colínio .....	32
3.4 - Determinação dos parâmetros solvatocrômicos das soluções aquosas de LIs ...	34
3.4.1 - Determinação dos parâmetros solvatocrômicos das soluções aquosas de cloretos de imidazólios.....	34
3.4.2 - Determinação dos parâmetros solvatocrômicos das soluções aquosas dos alcenoatos de colínio .....	38
3.5 – Extração da cinaropicrina a partir das folhas de <i>C. cardunculus</i> L. usando soluções aquosas de líquidos iônicos.....	40
3.6 – Extração da cinaropicrina com surfactantes convencionais comparando com [C <sub>14</sub> mim]Cl .....	43
3.7 – Otimização das condições de extração da cinaropicrina com soluções aquosas de LI.....	44
<b>4 - Conclusão final .....</b>	<b>49</b>
<b>5 - Trabalho futuro .....</b>	<b>53</b>
<b>6 - Bibliografia .....</b>	<b>57</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1</b> - <i>Cynara cardunculus</i> L.....	3
<b>Figura 2</b> - Imagens das três variedades de <i>C. cardunculus</i> L.: (A) <i>sylvestris</i> (Lamk) (cardo selvagem); (B) <i>scolymus</i> (L.) Fiori (alcachofra); (C) <i>altilis</i> DC (cardo cultivado) [4]. ...	4
<b>Figura 3</b> - Estrutura química da cinaropicrina.....	7
<b>Figura 4</b> - Sistema de extração em <i>Soxhlet</i> .....	9
<b>Figura 5</b> - Estruturas químicas, nomes e abreviaturas de alguns cátions e aniões de LIs. .....	11
<b>Figura 6</b> - Corantes utilizados para a determinação de parâmetros solvatocrômicos de LIs: i) <i>N,N</i> -dietil-4-nitroanilina; ii) Reichardt; iii) 4-nitroanilina.....	15
<b>Figura 7</b> -Curva de calibração para a cinaropicrina (área do sinal versus concentração (mg/mL)). .....	24
<b>Figura 8</b> - Cromatograma do extrato da folha do cardo. ....	31
<b>Figura 9</b> - Cromatograma de HPLC de um extrato em diclorometano de folha de <i>C. cardunculus</i> . ....	32
<b>Figura 10</b> - Variação da condutividade específica (K) em função da concentração do [Ch]C <sub>8</sub> a 308,15 K. ....	33
<b>Figura 11</b> - Efeito da concentração das soluções aquosas de [C <sub><i>n</i></sub> mim]Cl no parâmetro $\alpha$ . .....	35
<b>Figura 12</b> - Efeito da concentração das soluções aquosas de [C <sub><i>n</i></sub> mim]Cl no parâmetro $\beta$ . .....	36
<b>Figura 13</b> - Efeito da concentração das soluções aquosas de [C <sub><i>n</i></sub> mim]Cl no parâmetro $\pi^*$ . .....	37
<b>Figura 14</b> - Efeito do comprimento da cadeia alquílica das soluções aquosas dos diferentes LIs [C <sub><i>n</i></sub> mim]Cl (500mM) na variação dos parâmetros solvatocrômicos. ....	37
<b>Figura 15</b> - Efeito da concentração das soluções aquosas de [Ch]C <sub><i>n</i></sub> no parâmetro $\alpha$ . .	38
<b>Figura 16</b> - Efeito da concentração das soluções aquosas de [Ch]C <sub><i>n</i></sub> no parâmetro $\beta$ . ...	39
<b>Figura 17</b> - Efeito da concentração das soluções aquosas de LIs do tipo [Ch]C <sub><i>n</i></sub> no parâmetro $\pi^*$ . ....	40
<b>Figura 18</b> - Influência do carácter hidrotrópo e micelar do líquido iónico na extração da cinaropicrina. Condições de extração: T=25°C, R <sub>(S/L)</sub> =1:10, t=2h. ....	41
<b>Figura 19</b> - Efeito da estrutura química dos LIs no rendimento de extração da cinaropicrina e solventes convencionais (condições de extração T=25°C, R <sub>(S/L)</sub> = 1:10, t=2h, C=500mM). ....	42
<b>Figura 20</b> - Efeito dos surfactantes convencionais a diferentes concentrações comparando com solução aquosa de [C <sub>14</sub> mim]Cl. Condições de extração: T=25°C, R <sub>(S/L)</sub> =1:10, t=2h. .....	43
<b>Figura 21</b> - Efeito da concentração da solução aquosa de [C <sub>14</sub> mim]Cl no rendimento de extração de cinaropicrina. Condições de extração: T=25°C, t=2h, R <sub>(S/L)</sub> =1:10.....	44
<b>Figura 22</b> - Efeito da temperatura no rendimento de extração de cinaropicrina com uma solução aquosa de 500 mM de [C <sub>14</sub> mim]Cl. Condições de extração: t=2h, R <sub>(S/L)</sub> =1:10.	45
<b>Figura 23</b> - Extração da cinaropicrina da folha do cardo com uma solução aquosa de 500 de mM de [C <sub>14</sub> mim]Cl. Condições de extração: T=70°C t=2h,R <sub>(S/L)</sub> =1:10. ....	46
<b>Figura 24</b> - Efeito do tempo no rendimento de extração de cinaropicrina com uma solução aquosa de 500 mM de [C <sub>14</sub> mim]Cl. Condições de extração: R <sub>(S/L)</sub> =1:10, T=25°C. ....	46

**Figura 25** - Efeito da razão-sólido líquido no rendimento de extração de cinaropicrina com uma solução aquosa de 500 mM de [C<sub>14</sub>mim]Cl. Condições de extração: T=25°C, t=1h..... 47

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1</b> - Rendimentos da fração lipofílica (extrato em diclorometano) nas diferentes partes morfológicas do <i>C. cardunculus</i> L. [15].	6
<b>Tabela 2</b> - Composição (g de composto / kg de folha seca) da fração lipofílica presentes nas folhas de <i>Cyanra cardunculus</i> L. [15].	6
<b>Tabela 3</b> - Métodos utilizados na recuperação de extratos a partir de LIs (adaptado de [31]).	13
<b>Tabela 4</b> - Soluções padrões para a curva de calibração da cinaropicrina e respetiva área obtida por HPLC a 198 nm.	24
<b>Tabela 5</b> - Concentrações das soluções aquosas de LI utilizadas para medir os parâmetros solvatocrómicos.	26
<b>Tabela 6</b> - Concentrações das soluções aquosas de LI e das soluções aquosas dos surfactantes convencionais usadas na extração da cinaropicrina a partir da folha de <i>C. cardunculus</i> L.	27
<b>Tabela 7</b> - Valores das CMC reportados na literatura e/ou obtidos experimentalmente para os alcenoatos de colínio ([Ch][C <sub>n</sub> ]) e cloretos de imidazólio ([C <sub>n</sub> mim]Cl).	33



## Lista de abreviaturas

<b>SFE</b>	Extração com fluídos supercríticos ( <i>supercritical fluids extraction</i> )
<b>LIs</b>	Líquidos iônicos
<b>LSTs</b>	Lactonas sesquiterpênicas
<b>VOCs</b>	Solventes orgânicos voláteis ( <i>volatile organic solvents</i> )
<b>COSMO-RS</b>	<i>COnductor like Screening MOdel for Real Solvents</i>
<b>SC-CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono supercrítico
<b>T</b>	Temperatura
<b>UV-Vis</b>	Espectroscopia de Ultra-Violeta-Visível
<b>KT</b>	Kamlet-Taft
<b>CMC</b>	Concentração micelar crítica
<b>GC-MS</b>	Cromatografia gasosa de massa
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>HPLC-MS</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência combinada com espectrometria de massa
<b>RMN</b>	Ressonância magnética nuclear
<b>R<sub>s</sub>/L</b>	Razão sólido-líquido
<b>S-L</b>	Sólido-líquido
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sódio
<b>CPC</b>	Cloreto de hexadecilpiridínio
<b>CTAC</b>	Cloreto de (1-hexadecil)trimetilamônio
<b>SDBS</b>	Dodecifenilsulfato de sódio
<b>CTAB</b>	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
<b>Genopal C-100</b>	Genopal C-100
<b>E<sub>T</sub>(30)</b>	Corante de betaína de Reichardt
<b>α</b>	Parâmetro solvatocrômico da acidez
<b>β</b>	Parâmetro solvatocrômico da basicidade
<b>π*</b>	Parâmetro solvatocrômico de dipolaridade / polarizabilidade



## Lista de líquidos iónicos

<b>Fórmula química</b>	<b>Designação (IUPAC)</b>
[C <sub>2</sub> mim]Cl	Cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio
[C <sub>4</sub> mim]Cl	Cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio
[C <sub>8</sub> mim]Cl	Cloreto de 1-octil-3-metilimidazólio
[C <sub>10</sub> mim]Cl	Cloreto de 1-decil-3-metilimidazólio
[C <sub>12</sub> mim]Cl	Cloreto de 1-dodecil-3-metilimidazólio
[C <sub>14</sub> mim]Cl	Cloreto de 1-metil-3-tetradecilimidazólio
[C <sub>4</sub> mim][N(CN) <sub>2</sub> ]	Dicianamida de 1-butil-3-metilimidazólio
[Ch]C <sub>8</sub>	Octanoato de colínio
[Ch]C <sub>10</sub>	Decanoato de colínio
[Ch]C <sub>12</sub>	Dodecanoato de colínio
[Ch]C <sub>14</sub>	Tetradecanoato de colínio



# **1 - Introdução**



## 1.1 - Considerações gerais sobre *Cynara cardunculus* L.

### 1.1.1 - Taxonomia e distribuição geográfica

A *Cynara cardunculus* L. (Figura 1), usualmente designado por cardo-do-coalho, cardo espanhol ou simplesmente cardo, é uma das espécies do género *Cynara* mais abundantes em Portugal. É membro da família *Compositae* (*Asteraceae*), dentro de um grupo relativamente pequeno de espécies que compreende cerca de oito taxas [1].

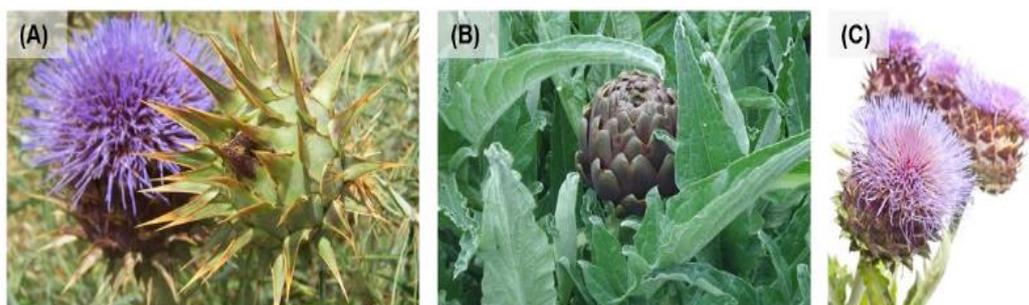


**Figura 1** - *Cynara cardunculus* L..

O género *Cynara* é constituído por oito espécies, nomeadamente *C. cardunculus* L., *C. syriaca* Boiss., *C. auranitica* Post, *C. cornigera* Lindley, *C. algarbiensis* Cosson, *C. baetica* (Spreng.) Pau, *C. Cyrenaica* Maire e *C. humilis* L. [2]. A *C. cardunculus* L. encontra-se presente em quase toda a costa mediterrânica, e é constituída por duas subespécies selvagens, nomeadamente subsp. *cardunculus* e subsp. *Flavescens*, que diferem nas características das brácteas e na sua distribuição geográfica [2]. A primeira subespécie está mais presente na zona oeste do mediterrâneo, nomeadamente no Chipre, Grécia, Itália Central e Sul, Sicília e Sardenha, enquanto a segunda é mais comum na Península Ibérica e na região Macaronésia [2]. Cada cardo produz entre 600 e 30000 sementes que são dispersas pelo vento, embora a planta também pode ter reprodução vegetativa [3].

### 1.1.2 - Características morfológicas do cardo

A *C. cardunculus* L. é uma espécie que pertence à classe das angiospermas eudicotiledónea (plantas que apresentam grão de pólen triaperturado, característica derivada de um ancestral comum). O cardo é subclassificado em três variedades: *sylvestris* (Lamk) Fiori (cardo selvagem), *scolymus* (L.) Fiori (alcachofra) e *atilis* DC (cardo cultivado) [4]. Na Figura 2 estão representadas as variedades anteriormente referidas, e as principais diferenças morfológicas entre cada uma delas.



**Figura 2** - Imagens das três variedades de *C. cardunculus* L.: (A) *sylvestris* (Lamk) (cardo selvagem); (B) *scolymus* (L.) Fiori (alcachofra); (C) *atilis* DC (cardo cultivado) [4].

O cardo selvagem (Figura 2 A) caracteriza-se por ser uma planta perene com estames eretos, possuir uma roseta, folhas espinhosas e caules ramificados com capítulos florais de cor azul-violeta, agregadas na base de cada segmento [5]. A alcachofra (Figura 2 B) foi domesticada através do alargamento dos capítulos florais, exibindo brácteas entalhadas na ponta. O cardo cultivado (Figura 2 C) difere do cardo selvagem por ser maior em altura, ter inflorescências de maior tamanho, não possuir espinhos nos caules por estes serem mais grossos [4,6]. Esta subclasse tem sido considerada uma cultura com potencial de exploração agro-industrial sustentável [7,8] nos países do sul da Europa e dos solos Mediterrânicos [7,9], por ser resistente e robusta face às condições climáticas [10]. A subclasse em estudo neste trabalho é o cardo cultivado devido das vantagens que vão ser discutidas nos tópicos que se seguem.

## 1.2 - Aplicações de *C. cardunculus* L.

A *C. cardunculus* pode ser cultivada como uma cultura perene com uma produtividade anual que varia entre 15 e 24 ton/ha [10]. Esta planta apresenta potencial utilização como biocombustível sólido ou na produção de pasta de papel, e o óleo das sementes para a produção de biodiesel [7,8,11]. Por outro lado, vários autores reportaram a utilização de

*C. cardunculus* L. para outras aplicações, como a utilização das folhas na alimentação humana da zona mediterrânica [7].

As proteínas aspárticas, dos extratos aquosos da parte das flores do cardo, têm sido utilizadas durante séculos como coagulantes vegetais (substituto do coalho) para produção de queijos de ovelha tradicionais na península ibérica [12]. Hoje em dia, o queijo de ovelha produzido com extratos de *cynara* tornou-se um produto bastante procurado devido às suas propriedades organoléticas únicas [7].

A extração e a aplicação de compostos bioativos a partir do cardo constitui outra área de interesse crescente, estando neste grupo quatro compostos particularmente importantes e procurados pela indústria farmacêutica, nomeadamente a inulina, a cinarina, a silimarina e a cinaropicrina [13]. A inulina, que se encontra na raiz, é um oligossacárido que possui um efeito benéfico na flora intestinal humana [13]. Os três últimos, são compostos amargos, que se encontram nas folhas e podem estimular a secreção dos sucos digestivos, especialmente o aumento da segregação da bÍlis pelo fÍgado, descongestionando-o e facilitando a digestão, além de diminuir os nÍveis de colesterol no sangue [13,14].

### **1.3 - Composição química da *C. cardunculus* L.**

A composição química de *C. cardunculus* L. será descrita em três partes morfológicas distintas: o caule, a capitula e as folhas (Tabela 1).

Ramos *et al.* [15] demonstraram que as folhas do cardo apresentam um maior rendimento de extração de compostos lipofÍlicos, 17 vezes superior aos obtidos para o caule. Os principais compostos lipofÍlicos identificados nas folhas do cardo foram compostos aromáticos, ácidos gordos, álcoois alifáticos de cadeia longa, lactonas sesquiterpénicas esteróis e triterpenos pentacíclicos.

**Tabela 1** - Rendimentos da fração lipofílica (extrato em diclorometano) nas diferentes partes morfológicas do *C. cardunculus* L. [15].

Parte morfológica		Rendimento da Extração (% m/m)
Caule	Interior	1,0
	Exterior	2,0
Capitula	Receptáculo e Brácteas	3,3
	Flor	4,5
<b>Folhas</b>		<b>17,3</b>

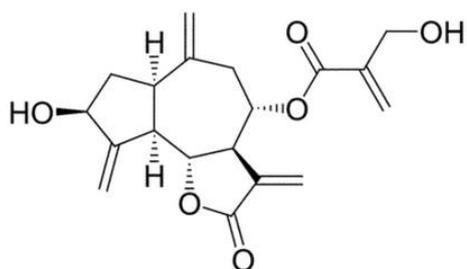
Na Tabela 2 descreve-se de forma resumida as principais famílias de compostos lipofílicos presentes nas folhas de cardo [15].

**Tabela 2** - Composição (g de composto / kg de folha seca) da fração lipofílica presentes nas folhas de *Cynara cardunculus* L. [15].

Compostos	Folhas (g de composto/kg da folha seca)
<b>Compostos aromáticos</b>	0,5
<b>Ácidos gordos</b>	3,7
<b>Álcoois alifáticos de cadeia longa</b>	1,8
<b>Lactonas sesquiterpénicas</b>	94,5
Grosheimina	6,2
Deacilcianropicrina	0,8
Cinaropicrina	<b>87,5</b>
<b>Esteróis</b>	1,3
<b>Triterpenos pentacíclicos</b>	13,9

Os compostos lipofílicos extraídos em maior quantidade das folhas do cardo (Tabela 2) são as lactonas sesquiterpénicas (LSTs), uma classe de sesquiterpenóides que se encontram amplamente distribuídas nas plantas [15]. Dentro das lactonas sesquiterpénicas, a cinaropicrina (Figura 3) é o composto mais abundante nas folhas de *Cynara cardunculus* L., representando cerca de 92% do conteúdo total de lactonas sesquiterpénicas [15]. A importância deste composto deve-se às inúmeras atividades biológicas que apresenta tais

como propriedades anti-inflamatórias e anti-cancerígenas com elevado interesse para as indústrias farmacêuticas [16]. Esta molécula contribui de forma determinante para o sabor amargo e peculiar desta planta [14]. Paralelamente é muito solúvel em álcoois e possui uma solubilidade baixa em água, cerca de 1,75 g/L a 20°C [17]. O padrão analítico é vendido em pequenas quantidades e possui um elevado valor comercial (18,3 €/mg, quando possui um grau de pureza de 97,5%) [18]. Além disso, algumas sínteses são extremamente complexas e apresentam toxicidade associada. Usualmente as flores do cardo são utilizadas enquanto que as suas folhas são descartadas, logo estas possuem um valor comercial reduzido. Perante as inúmeras propriedades e aplicações, a extração deste composto bioativo que se encontra presente nas folhas do cardo considera-se extremamente importante, contribuindo assim para a valorização destas espécies.



**Figura 3** - Estrutura química da cinaropicrina.

Além dos compostos referidos anteriormente, vários estudos demonstraram também a presença de compostos fenólicos no cardo, nomeadamente polifenóis, flavonóides, taninos condensados, entre outros [11,19,20].

## 1.4 - Atividade biológica da cinaropicrina

O cardo contém imensos compostos provenientes do metabolismo secundário que são usados na medicina moderna. A cinaropicrina, como muitas outras lactonas sesquiterpénicas, apresenta várias propriedades medicinais, que se encontram referenciadas mais abaixo, entre as quais a sua atividade anticancerígena [21]. A cinaropicrina é caracterizada por poder reagir com os grupos sulfidrilo de resíduos de cisteína [22,23], apresentando forte atividade citotóxica e destruindo, em concentrações muito baixas, células tumorais [24]. Cho *et al.* [25] demonstraram que a cinaropicrina apresenta propriedades inibitórias da produção do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), o

qual está envolvido em processos inflamatórios e tumorais. Além disso, a eficiência da cinaropirina foi comparada à prednisolona, um potente anti-inflamatório da família dos glicocorticóides [25], demonstrando que aquele composto pode interferir na resposta inflamatória através da inibição da produção de mediadores inflamatórios. O seu efeito inibidor é controlado pela conjugação com os grupos sulfidrilo das proteínas em causa [25]. Também já foi evidenciado que a cinaropirina impede o fotoenvelhecimento da pele e possui um efeito benéfico significativo no tratamento de lesões da mucosa gástrica, evitando a gastrite aguda [14]. Pandey *et al.* [21] demonstraram ainda que a cinaropirina possui efeitos imunomoduladores e inibe a proliferação de linhas celulares de cânceres como a leucemia ou o linfoma.

Dado o seu elevado interesse, este trabalho visa a utilização de soluções aquosas de LIs, como potenciais solventes alternativos face aos solventes orgânicos voláteis tradicionais, para a extração da cinaropirina.

## **1.5 - Extração de compostos bioativos a partir da biomassa**

A extração e a purificação são etapas fundamentais para a obtenção de compostos de alto valor acrescentado a partir de fontes naturais. A utilização de uma técnica de extração adequada é determinante para a identificação e caracterização de compostos bioativos assim como para a sua obtenção em larga escala [26]. A escolha do solvente de extração é essencial para obter um bom rendimento e seletividade do processo em relação ao composto pretendido [27], bem como para permitir a implementação de um processo sustentável e ambientalmente aceite.

As técnicas de extração convencionais existentes, como a extração por *Soxhlet*, maceração, decocção e hidrodestilação [27,28], baseiam-se na capacidade de extração dos solventes utilizados e na utilização de calor e/ou agitação. A técnica de decocção consiste em manter o material vegetal em contato com um solvente (normalmente água) em ebulição durante um tempo determinado. A aplicação desta técnica é restrita, uma vez que muitas substâncias naturais são suscetíveis de degradação com aquecimento prolongado. A hidrodestilação é geralmente usada para extrair óleos essenciais de forma muito seletiva, com recurso a uma corrente de vapor de água que rompe os tecidos vegetais libertando as gotículas de óleo que são arrastadas pela corrente de vapor. A extração sólido-líquido (S-L) é uma técnica convencional de extração dos compostos de interesse a partir de uma matriz sólida utilizando um solvente apropriado. Este tipo de

extração é uma operação unitária simples, muito usada para isolar diversos extratos/compostos a partir da biomassa, devido à sua fácil utilização e pelo fato de ser apropriada para processos em larga escala [26,29]. A extração em *Soxhlet* é também um processo de extração S-L, sendo uma alternativa à maceração convencional. Este método envolve a extração contínua de uma amostra sólida com uma quantidade limitada de solvente, devido aos vários ciclos sequenciais de destilação/condensação do solvente sobre a amostra [30]. Apesar da sua simplicidade (Figura 4), a sua utilização em larga escala é vista como desvantajosa, uma vez que se trata de um método moroso e que requer um elevado consumo energético além de usar solventes orgânicos voláteis, que em alguns casos são tóxicos [31,32]. Além disso, as temperaturas empregues, próximas do ponto de ebulição do solvente utilizado, podem não ser adequadas quando na presença de compostos termolábeis. É de salientar que alguns dos estudos de caracterização da fração lipofílica do cardo foram realizados utilizando extração em *Soxhlet* com diclorometano durante 7 horas [15]. O diclorometano é o solvente escolhido neste caso porque é um solvente relativamente selectivo para compostos lipofílicos.



**Figura 4** - Sistema de extração em *Soxhlet*.

Apesar destas técnicas continuarem a ser as mais empregues, apresentam desvantagens, nomeadamente, o uso de solventes orgânicos, longos tempos de extração, temperaturas elevadas, necessidade de evaporação de grandes quantidades de solventes, baixa seletividade e, em alguns casos levam à degradação de compostos termolábeis [28]. Para superar estas dificuldades, têm sido introduzidas novas técnicas de extração,

nomeadamente, a extração assistida por ultrassons, micro-ondas, e extração com fluídos supercríticos, líquidos iónicos, solventes eutéticos profundos, entre outros [27,28,31,33]. A extração com fluídos supercríticos (SFE), em particular com CO<sub>2</sub> (SC-CO<sub>2</sub>), tem sido proposta como uma alternativa à extração com solventes convencionais. Um fluido no estado supercrítico tem propriedades de penetração e de transporte próximas de um gás, mas atua como um líquido dissolvendo os compostos de uma determinada matriz. A eficiência e a seletividade da SFE podem também ser controladas através do controlo de pressão, de temperatura e de adição de um co-solvente. O dióxido de carbono tem sido o fluído mais utilizado devido aos seus valores de pressão e temperatura crítica e pelo fato de não ser tóxico [27,34]. No entanto, o SC-CO<sub>2</sub> é mais eficaz para compostos apolares, embora as suas propriedades de extração possam ser igualmente ajustadas como acima referido. Contudo, o investimento necessário para o estabelecimento deste método é elevado, pois requer equipamentos complexos e elevadas pressões [27].

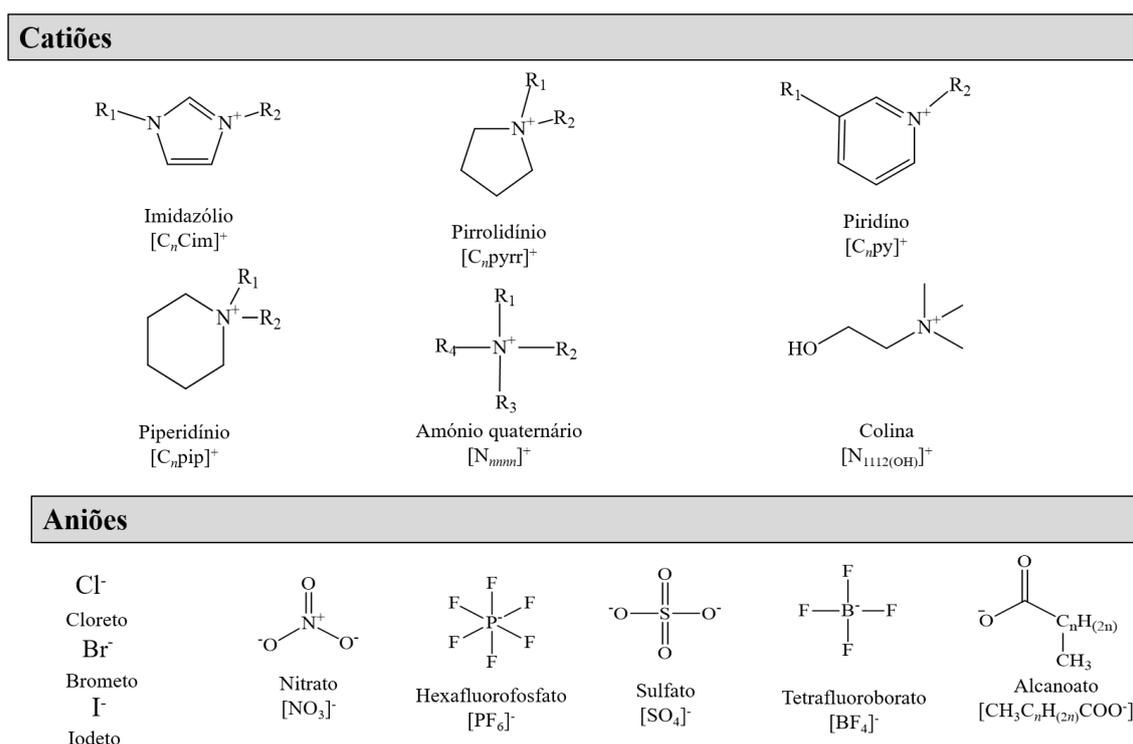
Após a extração é necessário utilizar técnicas analíticas para caracterizar os extratos obtidos. A composição química destes é principalmente avaliada por cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa (GC-MS) e/ou por cromatografia líquida de elevada eficiência combinada com espetrometria de massa (HPLC-MS) [4]. Algumas lactonas sesquiterpénicas [35], triterpenos pentacíclicos [36] e compostos fenólicos [35,37] isolados a partir de *C. cardunculus* L., foram primeiramente caracterizados por GC-MS e HPLC-MS, e adicionalmente foi confirmada a estrutura de alguns destes compostos por RMN [4].

## **1.6 - Líquidos iónicos como solventes alternativos**

Os líquidos iónicos (LIs) são sais constituídos por catiões orgânicos de grandes dimensões e aniões que podem ser orgânicos ou inorgânicos. Estes sais apresentam uma temperatura de fusão inferior a 100°C, sendo que um número considerável se encontra no estado líquido à temperatura ambiente [38]. Os seus baixos pontos de fusão, comparativamente com os sais comuns, devem-se às fracas ligações electrostáticas e baixa simetria, o que dificulta o seu empacotamento e inibe a formação de uma estrutura cristalina organizada [31,39,40]. A sua natureza iónica faz com que estes solventes apresentem propriedades físicas e químicas muito vantajosas quando comparadas com os solventes orgânicos comuns, tais como a sua baixa volatilidade e a sua elevada capacidade de solvatação para compostos polares e apolares, elevada estabilidade térmica e química, serem não-

inflamáveis e o fato de se manterem líquidos numa larga gama de temperaturas [41–43]. A forma como as suas propriedades podem ser manipuladas por escolha do catião e do anião é uma vantagem adicional pois permite a alteração das suas características físico-químicas de forma a otimizar uma determinada aplicação, como é o caso da extração de um determinado composto [31,42,44]. Existe um elevadíssimo número de possíveis combinações de catiões e aniões para LIs, conferindo-lhes a designação de “*designer solvents*” [38,45].

De entre o vastíssimo leque de catiões de LIs, os mais utilizados são baseados num número restrito de famílias, como imidazólio, pirrolidínio, piridínio, piperidínio, amónios ou fosfónios quaternários, combinados com uma enorme variedade de aniões, desde o cloreto, brometo, hexafluorofosfato, tetrafluoroborato, entre muitos outros [31,42]. Algumas destas estruturas iónicas e respetivas abreviaturas estão representadas na Figura 5.



**Figura 5** - Estruturas químicas, nomes e abreviaturas de alguns catiões e aniões de LIs.

Os LIs têm sido aplicados em diversas áreas, como na síntese orgânica, catálise/biocatálise, em reações químicas, em bioprocessos, processos de extração e de separação [39,43]. No entanto, apesar de todos os benefícios ambientais que os LIs possam apresentar, estes não são completamente desprovidos de toxicidade [39,42].

Embora possam diminuir o risco de poluição, devido à sua baixa pressão de vapor, alguns podem ter uma solubilidade significativa em água podendo assim representar uma potencial ameaça para os organismos aquáticos [39,42]. Segundo alguns estudos, a toxicidade dos LIs é determinada primordialmente pela natureza do cátion e está diretamente correlacionada com o comprimento da cadeia alquílica lateral [39,42]. Assim, a procura de aniões e cátions mais biodegradáveis, biocompatíveis, não tóxicos e menos dispendiosos tem recebido um especial destaque nos últimos anos [31]. Alguns exemplos incluem LIs obtidos a partir de ácidos carboxílicos, aminoácidos, colina, entre outros [31].

No entanto, o uso de LIs em processos de extração, em alternativa aos solventes tradicionais, tem despertado grande atenção, pela sua capacidade de melhorar os rendimentos, a seletividade e a velocidade de extração [46] como será detalhadamente discutido na secção seguinte.

## **1.7 - Extração e isolamento de compostos de valor acrescentado a partir da biomassa utilizando líquidos iónicos**

Um dos principais desafios para uma extração eficiente de compostos de valor acrescentado a partir de fontes naturais reside na substituição dos solventes comuns por solventes mais seletivos, mais eficientes, mais benignos e pela otimização do método de extração de forma a conseguir processos mais rápidos, com menor custo associado e mais sustentáveis. De acordo com a literatura [31], a larga maioria dos estudos de extração de compostos de valor acrescentado utilizando LIs puros ou soluções destes empregaram extrações do tipo sólido-líquido (S-L). Contudo, de forma a obter melhores rendimentos de extração, em cerca de dois terços dos trabalhos a extração envolveu o recurso a irradiação com micro-ondas ou ultrassons [31].

Com base na revisão de Passos *et al.* [31] os LIs devem ser selecionados dependendo do composto de interesse de modo a melhorar a seletividade e a eficiência de extração, bem como pelo seu custo e capacidade de recuperação e reutilização do LI. De acordo com Passos *et al.* [31], as três principais abordagens para extrair compostos bioativos de fontes naturais envolvem LIs puros, e soluções aquosas ou alcoólicas (etanol ou metanol) de LIs. De uma forma geral, a utilização dos LIs puros é viável apenas quando aqueles são líquidos à temperatura ambiente e apresentam baixas viscosidades. No caso de serem LIs viscosos, a eficiência de extração será baixa devido à fraca penetração destes na biomassa

[31]. Além disso, são frequentemente necessárias temperaturas elevadas quando se trabalha com LIs puros quer para exceder o seu ponto de fusão, quer para reduzir a sua viscosidade, o que pode levantar problemas de degradação de componentes termolábeis e encarece o processo. Contudo, algumas destas limitações podem ser superadas através da utilização de soluções de LIs em água ou álcoois, o que reduz a viscosidade e permite que o processo de extração ocorra a temperaturas mais baixas, além de reduzir a quantidade de LIs usados e o custo associado [31]. Além disso, já foi provado por Cláudio *et al.* [47] que soluções aquosas de LIs aumentam de forma muito significativa a solubilidade de alguns compostos comparativamente com a sua solubilidade em água ou no LI puro. Para além das vantagens acima referidas, alguns autores mostraram a capacidade dos LIs atuarem como surfactantes [48,49] ou hidrotrópos [50] quando em solução aquosa, o que permite aumentar significativamente a solubilidade de compostos poucos solúveis em água e por sua vez aumentar o rendimento de extração [50]. Apesar do bom desempenho dos LIs e respetivas soluções aquosas na extração de compostos de valor acrescentado a partir da biomassa, o seu posterior isolamento/purificação tem sido um desafio, uma vez que a ausência de pressão de vapor é aqui uma desvantagem. Assim, várias abordagens alternativas têm sido estudadas com vista à recuperação de diferentes famílias de compostos naturais a partir dos meios de extração baseados em LIs (Tabela 3).

**Tabela 3** - Métodos utilizados na recuperação de extratos a partir de LIs (adaptado de [31]).

<b>Família de compostos</b>	<b>Método de isolamento</b>
<b>Alcalóides</b>	Re-extração com solventes orgânicos.
<b>Flavonóides</b>	Destilação do LI.
<b>Terpenóides</b>	Extração de fase sólida.
	Hidrodestilação.
	Precipitação com água.
<b>Compostos aromáticos</b>	Resina de troca iónica.
	Destilação do LI.
<b>Misturas naturais</b>	Precipitação com água.
	Resina macroporosa.
<b>Outros</b>	Destilação do LI.
	Re-extração com solventes orgânicos.

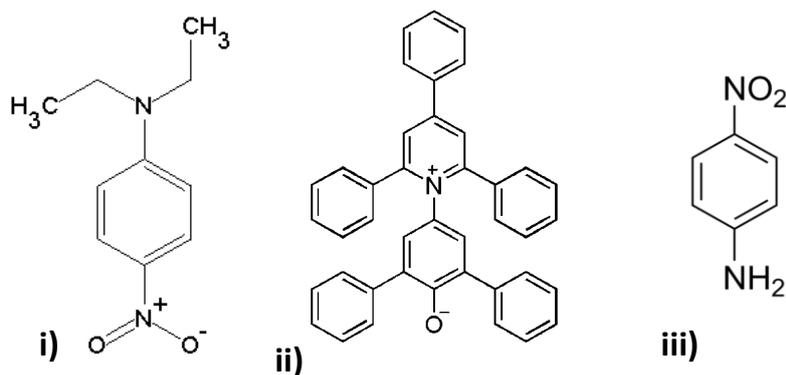
Apesar de os LIs serem solventes mais dispendiosos, permitem aumentar consideravelmente a eficiência de extração contribuindo assim para uma redução

considerável do custo associado ao processo [31,43]. Segundo Passos *et al.* [31] os LIs apresentam inúmeras vantagens e não devem ser descartados com base apenas no seu preço. A decisão de utilizar LIs como solventes alternativos deve ter em conta a eficiência do processo, a possibilidade de reutilizar e reciclar os solventes, o valor comercial dos produtos de valor acrescentado que vão ser extraídos e o custo do LI.

### 1.7.1 - Caracterização dos LIs: Parâmetros solvatocrômicos

Para uma aplicação eficaz de LIs como substitutos dos solventes orgânicos voláteis em diversas áreas, é crucial conhecer/explorar as suas propriedades, de modo a definir o solvente com propriedades adequadas para um determinado fim [51]. Quando o solvente é um LI, uma das características mais importantes são as interações específicas entre o solvente e o soluto [47], o que pode ser previsto pela avaliação da polaridade de ambos [52]. Um dos métodos frequentemente utilizados para estimar a capacidade de solvatação dos LIs é a determinação dos parâmetros solvatocrômicos ou parâmetros Kamlet-Taft (KT), que se baseiam na análise do comprimento de onda máximo obtido por espectroscopia de UV-Vis resultante da interação entre o LI e corantes específicos [51]. Existem 3 parâmetros de KT, nomeadamente  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\pi^*$ , que quantificam a capacidade do solvente para doar prótons (acidez), para aceitar prótons (basicidade) e polarizabilidade, respetivamente [53]. Estes parâmetros podem ainda ser utilizados para prever outros parâmetros, como frequências espectrais, solubilidade, constante de equilíbrio e constantes de velocidades [54]. Além dos parâmetros de KT, a escala mais utilizada é o  $E_T(30)$ , uma medida da polarizabilidade do solvente, contudo também é sensível a ligações por pontes de hidrogénio [55].

Os dados publicados de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\pi^*$  para LIs são bastante restritos e dependem principalmente do conjunto de corantes solvatocrômicos utilizados [52]. Para a maioria dos solventes, e em particular para os líquidos iónicos, os corantes mais utilizados estão representados na Figura 6.



**Figura 6** - Corantes utilizados para a determinação de parâmetros solvatocrômicos de LIs: i) *N,N*-dietil-4-nitroanilina; ii) Reichardt; iii) 4-nitroanilina.

Recentemente, Cláudio *et al.* e Kurnia *et al.* [51] propuseram diversas equações para prever os parâmetros Kamlet-Taft em LIs, nomeadamente  $\alpha$  e  $\beta$ . Os autores [47,51] correlacionaram os valores reais dos parâmetros Kamlet-Taft com os valores das energias do par catião-anião de um determinado LI previstas pelo modelo COSMO-RS (COnductor like Screening MOdel for Real Solvents) e propuseram uma ferramenta alternativa para obter os parâmetros  $\alpha$  e  $\beta$ .



## 1.8 - Objetivos

Considerando o elevado interesse no desenvolvimento de um processo eficiente de extração e isolamento da cinaropicrina a partir da folha de *C. cardunculus* L., bem como o potencial das soluções aquosas de LIs na extração de compostos naturais, nesta tese será estudada a utilização de soluções aquosas de LIs como alternativa aos solventes orgânicos voláteis para viabilizar esse processo. De forma a atingir este objetivo, em primeiro lugar determinaram-se os parâmetros solvatocrômicos de soluções aquosas de alguns LIs, envolvendo cloretos de imidázolio e alcenoatos de colínio, de modo a utilizar esta informação que caracteriza as propriedades do solvente a par com os resultados de extração da cinaropicrina. As condições de extração com as soluções aquosas de LIs foram optimizadas, nomeadamente em termos de concentração de LI, tempo de extração, temperatura e razão sólido-líquido (biomassa-solvente) de forma a obter um maior rendimento de extração da cinaropicrina, permitindo por sua vez o desenvolvimento de um processo alternativo mais sustentável. Também se avaliou a performance das soluções aquosas de surfactantes tradicionais para comparação directa com os resultados obtidos com os LIs.



## **2 - Materiais e métodos**



## 2.1 - Amostras e reagentes

### 2.1.1 - Amostras

Neste trabalho utilizaram-se amostras de folha de *C. cardunuculus* L. fornecidas pelo Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-Alimentar do Alentejo (Cebal), com uma granulometria entre 40-60 mesh, que após secagem foram armazenadas à temperatura ambiente em local seco.

### 2.1.2 - Reagentes

Neste trabalho foram utilizados os seguintes LIs: cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio, [C<sub>2</sub>mim]Cl; cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio, [C<sub>4</sub>mim]Cl; cloreto de 1-octil-3-metilimidazólio, [C<sub>8</sub>mim]Cl; cloreto de 1-decil-3-metilimidazólio, [C<sub>10</sub>mim]Cl; cloreto de 1-dodecil-3-metilimidazólio, [C<sub>12</sub>mim]Cl; cloreto de 1-metil-3-tetradecilimidazólio, [C<sub>14</sub>mim]Cl; dicianamida de 1-butil-3-metilimidazólio, [C<sub>4</sub>mim][N(CN)<sub>2</sub>]; octanoato de colínio, [Ch]C<sub>8</sub>; decanoato de colínio, [Ch]C<sub>10</sub>; dodecanoato de colínio, [Ch]C<sub>12</sub>; tetradecanoato de colínio, [Ch]C<sub>14</sub>. Todos os LIs derivados do catião imidazólio foram adquiridos comercialmente na Iolitec, apresentando um grau de pureza superior a 98 % m/m. Os alcanatoatos de colínio foram sintetizados no laboratório, utilizando como reagentes hidróxido de colínio (Sigma 45% de metanol) e os respectivos ácidos carboxílicos: ácido octanóico (99 % m/m), ácido decanóico (97,8% m/m) e ácido dodecanóico (97,8 % m/m) da Aldrich. Para além dos LIs, também se estudaram surfactantes convencionais, nomeadamente o dodecilsulfato de sódio (SDS), genapol C-100, cloreto de hexadecilpiridínio mono-hidratado (CPC), e cloreto de (1-hexadecil)trimetilamónio (CTAC), obtidos da Alfa Asear, dodecilfenilsulfato de sódio (SDBS) da Sigma Aldrich e o brometo de hexadeciltrimetilamónio (CTAB) da Fluka. Todos os surfactantes utilizados apresentavam um grau de pureza superior a 99 % m/m, exceto no caso do CTAC que apresenta um grau de pureza de 96 % m/m. Os solventes utilizados foram: diclorometano, acetonitrilo, metanol, acetona, *n*-hexano e etanol obtidos da Fisher Chemical. Estes solventes apresentam grau de pureza igual a 99,9 % m/m, excepto o *n*-hexano e etanol com grau de pureza igual a 95% m/m. A cinaropicrina foi adquirida comercialmente à Extrasynthese, com um grau de pureza  $\geq 97.5$  % m/m. Os corantes utilizados para a determinação dos parâmetros solvatocrómicos foram o *N,N*-dietil-4-nitroanilina da Fluorochem, o de Reichardt e 4-nitroanilina da Aldrich. Todos os

corantes utilizados apresentam um grau de pureza igual a 99% m/m, exceto o corante de Reichardt que apresenta um grau de pureza igual a 90 % m/m.

## **2.2 - Análise da composição química do extrato lipofílico das folhas de *C. cardunculus* L.**

As amostras das folhas de cardo foram previamente submetidas a um ensaio de determinação do teor de humidade: foi colocada cerca de 1 g de amostra na estufa a uma temperatura de 105°C durante 72h até peso constante. Esta determinação foi realizada em duplicado.

Para extrair a fração lipofílica foi realizada uma extração de uma amostra de folhas de cardo (cerca de 3g (peso seco)) em *Soxhlet* com diclorometano durante 6 horas. O solvente foi removido recorrendo a um evaporador rotativo (modelo R-210 da *Buchi, Switzerland*), e o extrato foi pesado. O diclorometano foi selecionado por ser um solvente com afinidade para compostos lipofílicos [15].

Posteriormente, para a caracterização do extrato por GC-MS [4,15], uma alíquota com cerca de 10 mg de extrato foi dissolvido em 250 µL de piridina com padrão interno (tetracosano) numa concentração de 2,39 mg/mL e foi trimetilsililado pela adição de 250 µL de *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) e 50 µL de trimetilclorossilano (TMSCl), como catalisador. A mistura reacional foi colocada sob agitação a 70°C durante 30 minutos. A análise por GC-MS dos extratos derivatizados foi realizada com recurso a um equipamento *Trace Gas Chromatograph* equipado com um espectrómetro de massa DSQ II, ambos da Thermo Scientific. A separação dos compostos foi realizada numa coluna capilar DB-1 J&W (30m×0,32mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme), utilizando hélio como gás de arraste (35cm/s). As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura inicial de 80°C durante 5 minutos; aumento de 4°C/min até 260°C, seguido de um aumento de 2°C/min até 285°C, sendo a temperatura mantida durante 10 minutos, temperatura do injetor de 250°C, temperatura da linha de transferência de 290°C e uma razão de split de 1:50. O espectrómetro de massa foi usado no modo de impacto eletrónico a uma energia de 70eV e os dados obtidos foram recolhidos a uma taxa de 1scan/s, na gama de m/z 33-700. A fonte de ionização foi mantida a 250°C.

Uma vez que os estudos seguintes foram feitos em soluções aquosas procurou-se também verificar a estabilidade da cinaropicrina nestas condições. Para isso, pesou-se cerca de

39,5 mg do extrato em diclorometano, este foi redissolvido em 1 mL de uma mistura água:etanol (1:1), à temperatura ambiente, durante 2h, seguido extraído com 2 mL de diclorometano, que foi posteriormente seco com o auxílio do evaporador rotativo, derivatizado, e analisado por GC-MS como acima descrito.

Os compostos foram identificados como derivados de TMS por comparação dos seus espectros, massa e tempos de retenção característicos com dados da literatura [4,15].

## **2.3 - Quantificação da cinaropicrina por HPLC**

### **2.3.1 - Condições cromatográficas**

A quantificação da cinaropicrina nos extratos foi realizada por um equipamento de cromatografia líquida de alta pressão, com detetor *diode array* (HPLC-DAD), da empresa *Shimadzu*, com uma coluna *Reprosil C18* de 5 $\mu$ m e com um diâmetro do poro de 100 Å (dimensões da coluna 250 $\times$ 4,6mm), da *Maisch*. A obtenção dos dados e avaliação foram realizados utilizando o *software labsolution*. A fase móvel é constituída por 75% de água e 25% de acetonitrilo, com um fluxo de 0,5 mL/min em modo isocrático. A temperatura da coluna foi mantida a 30°C, e o detetor DAD fixo a um comprimento de onda de 198 nm. O tempo de corrida de cada amostra teve uma duração total de 30 minutos. Todas as soluções padrão e as amostras foram filtradas através de um filtro 0,45 $\mu$ m antes de cada injeção.

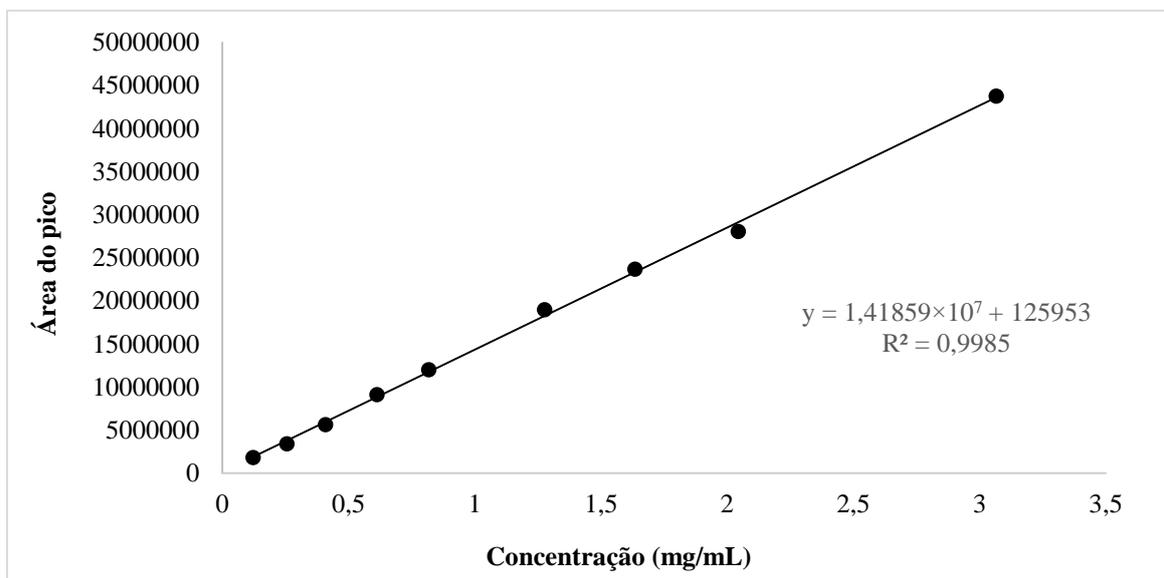
### **2.3.2 - Curva de calibração para quantificação da cinaropicrina**

As soluções padrão de cinaropicrina foram preparadas por diluição de uma solução mãe em metanol de concentração 4,09 mg/mL (Tabela 4). Cada solução-padrão foi injetada em duplicado no HPLC, obtendo-se a curva de calibração pretendida.

**Tabela 4** - Soluções padrões para a curva de calibração da cinaropirina e respectiva área obtida por HPLC a 198 nm.

Amostra	Cinaropirina [mg/mL]	Área
A- Sol. mãe	4,09	-----
B	3,07	43784366
C	2,04	28043133
D	1,64	23689331
E	1,28	18984213
F	0,82	11981923
G	0,61	9112853
H	0,41	5612518
I	0,26	3402016
J	0,12	1792544

A partir da regressão linear das áreas dos picos cromatográficos da cinaropirina, foi obtido uma reta de regressão (Figura 7) com a seguinte equação:  $y=1,41859 \times 10^7 x + 125953$  com  $R^2 = 0,9985$ , onde y e x representam, respectivamente, a relação entre a área do pico da cinaropirina e as suas concentrações. As soluções padrão foram preparadas e analisadas em duplicado.



**Figura 7** -Curva de calibração para a cinaropirina (área do sinal versus concentração (mg/mL)).

## 2.4 - Síntese de alcenoatos de colínio

A diferentes massas/volumes de cada um dos ácidos carboxílicos, nomeadamente 12,23 mL de ácido octanóico, 13,29 g de ácido decanóico e 15,48 g de ácido dodecanóico, adicionaram-se lentamente 20 mL de hidróxido de colina. No caso dos ácidos em estado sólido foi necessário dissolve-los previamente em metanol. A síntese dos alcenoatos de colínio foi realizada por uma reação ácido-base, e de acordo com o procedimento descrito por Muhammad *et al.*[56]. O ácido que não reagiu foi eliminado por precipitação com *n*-hexano. Todos os vestígios dos solventes (água, *n*-hexano e metanol) foram eliminados sob vácuo a 60°C durante 24 horas. Todo o processo acima descrito foi realizado sob uma atmosfera inerte para prevenir a degradação do hidróxido de colina. Os LIs sintetizados mostraram elevado grau de pureza, sem nenhum sinal de decomposição e um rendimento elevado, tendo sido confirmado por <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C RMN (dados não incluídos nesta tese).

## 2.5 - Determinação da concentração micelar crítica dos alcenoatos de colínio

Para determinar a concentração micelar crítica (CMC) das soluções aquosas dos alcenoatos de colínio que foram estudados, [Ch]C<sub>*n*</sub> (*n* = 8, 10, 12, 14), foi determinada a condutividade de diferentes soluções aquosas, utilizando um condutivímetro, *Russel* RL 105. As medições foram realizadas a 25°C. Foram utilizadas soluções aquosas com concentrações iniciais de LI de 816,9 mM, 318,7 mM, 91,1 mM e de 62,9 mM, para os LIs [Ch]C<sub>*n*</sub> (*n* = 8, 10, 12, 14), respetivamente, às quais se adicionou água Mili-Q gota a gota sob agitação. A CMC foi determinada pela interseção de duas funções lineares, com declives diferentes, de condutividade em função da concentração da solução aquosa de LI.

## 2.6 - Medição dos parâmetros solvatocrómicos das soluções aquosas de LIs

Para determinar os parâmetros solvatocrómicos, todas as amostras de LI foram secas sob vácuo, a 50°C durante 48 horas, para remover a água e eventuais impurezas voláteis. Os parâmetros solvatocrómicos das soluções aquosas de LIs foram medidos para os seguintes LIs: [C<sub>*n*</sub>mim]Cl (*n* = 8, 10, 12, 14) e [Ch]C<sub>*n*</sub> (*n* = 8, 10, 12 e 14). Para cada LI foram preparadas soluções aquosas nas gamas de concentrações descritas na Tabela 5.

**Tabela 5** - Concentrações das soluções aquosas de LI utilizadas para medir os parâmetros solvatocrômicos.

LI	Concentração (mM)
[C <sub>8</sub> mim]Cl	10; 100; 250; 500; 1000; 2000
[C <sub>10</sub> mim]Cl	100; 250; 500; 1000; 2000
[C <sub>12</sub> mim]Cl	10; 100; 500; 750; 1000; 1500; 2000
[C <sub>14</sub> mim]Cl	1; 10; 100; 250; 500; 1000
[Ch]C <sub>8</sub>	100; 250; 350; 500; 1000
[Ch]C <sub>10</sub>	10; 50; 100; 200; 500
[Ch]C <sub>12</sub>	10; 100; 500; 750; 1000; 1500; 2000
[Ch]C <sub>14</sub>	1; 10; 100; 250; 500; 1000

Retiram-se 400 µL de cada solução de LI para um eppendorf ao qual foi adicionado o corante de modo a emitir cor quando é dissolvido na solução aquosa. A quantidade de corante adicionada depende da absorvância de cada solução. Os corantes utilizados foram as seguintes: Reichardt, *N,N*-dietil-4-nitroanilina e 4-nitroanilina. De seguida registaram-se os espectros de UV-Vis, entre 700 nm a 200 nm num intervalo de 0,1 nm, à temperatura ambiente usando um espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2. Os parâmetros solvatocrômicos foram determinados pela identificação do comprimento de onda máximo. Os valores obtidos foram substituídos nas equações que se encontram na literatura [47,51].

## **2.7 - Extração da cinaropicrina das folhas de *Cynara cardunculus* L. com soluções aquosas de LIs, surfactantes e solventes convencionais**

O processo de extração da cinaropicrina a partir das folhas de *C. cardunculus* L. foi realizado com soluções aquosas de LIs (hidrotrópos e micelares), com soluções aquosas de surfactantes tradicionais (nas gamas de concentrações descritas na Tabela 6) e com solventes orgânicos voláteis (diclorometano, *n*-hexano e acetona) e água.

**Tabela 6** - Concentrações das soluções aquosas de LI e das soluções aquosas dos surfactantes convencionais usadas na extração da cinaropicrina a partir da folha de *C. cardunculus* L.

<b>Solventes</b>	<b>LI</b>	<b>Concentrações (mM)</b>
<b>LIs hidrotópicos</b>	[C <sub>2</sub> mim]Cl	100; 500; 1000
	[C <sub>4</sub> mim]Cl	100; 500; 1000
	[C <sub>4</sub> mim][N(CN) <sub>2</sub> ]	100; 500; 1000
<b>LIs micelares catiónicos</b>	[C <sub>8</sub> mim]Cl	10; 50; 350; 500; 1000
	[C <sub>10</sub> mim]Cl	10; 50; 350; 500; 1000
	[C <sub>12</sub> mim]Cl	10; 50; 350; 500; 1000
	[C <sub>14</sub> mim]Cl	10; 50; 350; 500; 1000
<b>LIs micelares aniônicos</b>	[Ch]C <sub>8</sub>	500
	[Ch]C <sub>10</sub>	500
	[Ch]C <sub>12</sub>	500
<b>Surfactantes convencionais</b>	CTAC	10; 50; 100; 500; 1000
	SDS	10; 50; 100; 500; 1000
	Genapol C-100	10; 50; 100; 500; 1000
	SDBS	10; 50; 100; 500; 1000
	CTAB	10; 50; 100; 500; 1000
	CPC	10; 50; 100; 500; 1000

Para os alcenoatos de colínio utilizou-se apenas a concentração de 500 mM, dado que se obteve uma melhor eficiência de extração com esta concentração com as soluções aquosas de LIs da família dos imidazólios. Também se procedeu ao estudo com os solventes tradicionais e com os surfactantes convencionais para complementar e comparar com as eficiências de extração obtidas com as soluções aquosas de LIs.

As primeiras extrações foram realizadas usando 0,25 g de amostra e 2,25 g de solvente e a extração foi realizada durante 2 h a 25°C, sob agitação constante a 1000 rpm. Posteriormente, além dos diferentes LIs e respectivas concentrações foram igualmente otimizados o tempo de extração (t= 0,5, 1, 2, 3, 5 e 24 h), a temperatura (T= 70, 45, 35 e 25°C) e razão sólido-líquido ( $R_{S/L}$  =1:10, 1:20, 1:30 e 1:40). Para determinar o teor de cinaropicrina, no final de cada ensaio, as amostras foram centrifugadas, retirou-se o sobrenadante e transferiu-se para outro eppendorf. De seguida, retiram-se 200 µL do sobrenadante e diluiu-se em 800 µL de metanol. Por fim, as amostras foram filtradas com

o auxílio de uma seringa com um filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  e a cinaropirina foi quantificada por HPLC.

## **3 - Resultados e discussão**



### 3.1 - Caracterização do extrato lipofílico das folhas de *C. cardunculus* L. por GC-MS

O primeiro passo deste trabalho consistiu na determinação do teor de humidade e de extratáveis das folhas de *C. cardunculus* L, procedendo-se de seguida à análise do extrato obtido com diclorometano por GC-MS. Todas as amostras foram analisadas em duplicado. A percentagem de humidade obtida da folha de *C. cardunculus* foi de  $(6,47 \pm 0,02)$  %. O rendimento de extração de extratáveis utilizando diclorometano como solvente de extração foi de  $(17,48 \pm 0,09)$  %. Este resultado é concordante com o valor reportado por Ramos *et al.* [15], com um rendimento de 17,3%.

O cromatograma de GC-MS (Figura 8) permite identificar claramente a cinaropirina como composto maioritário a um tempo de retenção de 51,23 min. O perfil cromatográfico obtido é concordante com o anteriormente reportado por Ramos *et al.* [15].

A análise por GC-MS também foi utilizada para avaliar a estabilidade da cinaropirina quando em contacto com água. Para isso, após a evaporação do diclorometano, redissolveu-se o extrato em 1 mL de mistura água:etanol (1:1), à temperatura ambiente por 2 h, seguido de uma nova extração com diclorometano (2 mL). Secou-se a amostra, derivatizou-se e analisou-se por GC-MS.

Analisando o cromatograma de GC-MS verificou-se que não houve alteração na intensidade do pico da cinaropirina. Assim sendo, como o objetivo deste trabalho consiste em extrair a cinaropirina com soluções aquosas de LIs, este resultado indica a viabilidade de utilizar soluções aquosas.

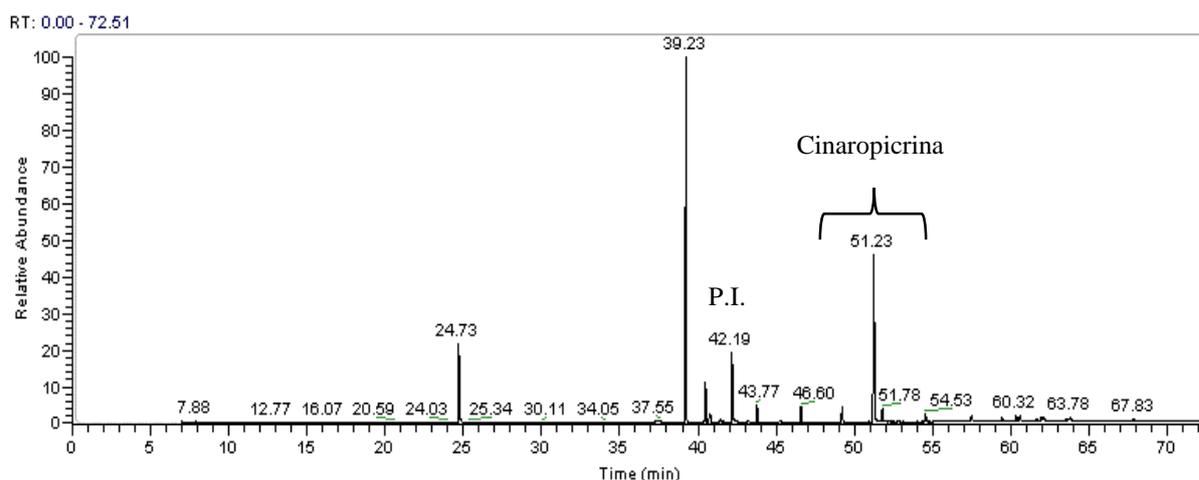


Figura 8 - Cromatograma do extrato da folha do cardo.

### 3.2 - Quantificação da cinaropicrina por HPLC no extrato em diclorometano

Antes de estudar a extração da cinaropicrina usando soluções aquosas de LIs, foi necessário estabelecer e validar o método de quantificação por HPLC. Embora a quantificação possa ser levada a cabo por CG-MS [4,15], a utilização de solventes não voláteis como os LIs exigiria um processo laborioso prévio para a sua remoção. Por outro lado, já foi descrita a quantificação por HPLC da cinaropicrina extraída do cardo [57]. Com esta técnica, a presença de LIs não interfere na quantificação da cinaropicrina dado que os tempos de retenção são muito diferentes.

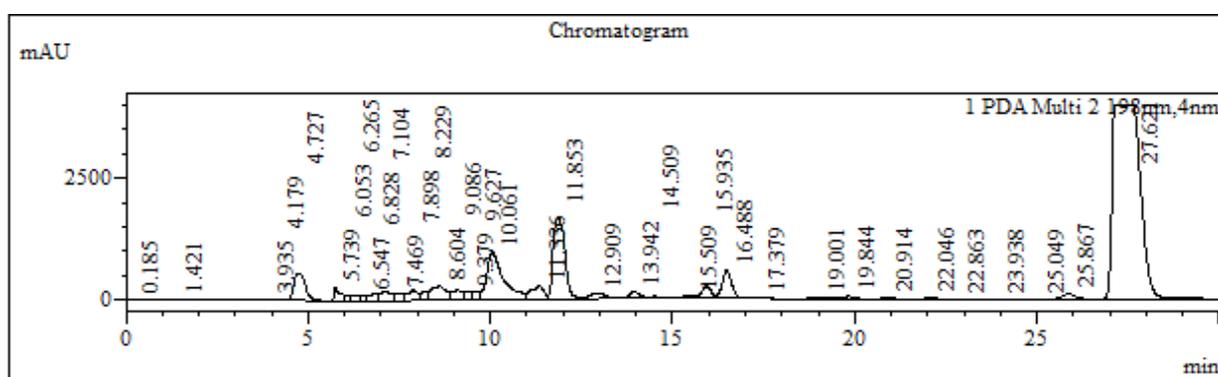


Figura 9 - Cromatograma de HPLC de um extrato em diclorometano de folha de *C. cardunculus*.

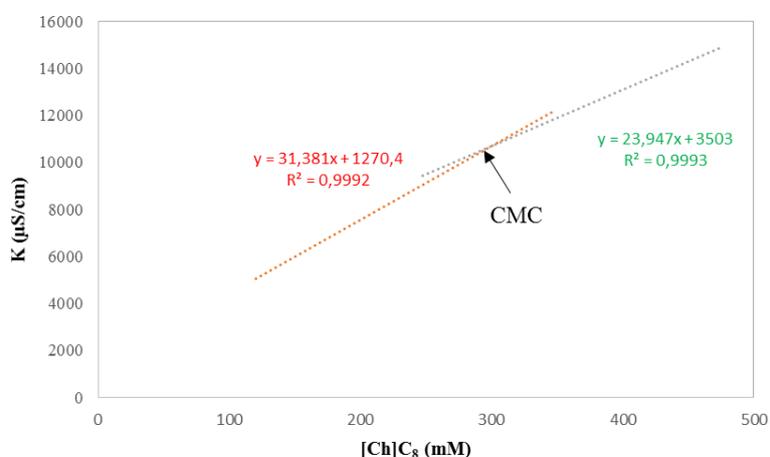
De acordo com o cromatograma apresentado na Figura 9 e comparando com o cromatograma obtido por GC-MS, verificou-se o mesmo perfil de seletividade para a cinaropicrina. O pico que corresponde ao composto de interesse encontra-se bem resolvido e é maioritário face aos restantes, com um tempo de retenção de 27,62 minutos.

### 3.3 - Determinação das Concentração Micelar Crítica (CMC) dos alcenoatos de colínio

A determinação da CMC é fundamental para qualquer processo de extração que envolva surfactantes. Neste trabalho determinaram-se as CMCs dos alcenoatos de colínios uma vez que estes dados não se encontram disponíveis na literatura para todos os compostos estudados. A CMC dos [Ch][C<sub>n</sub>] foi determinada com base nas curvas de condutividade em função da concentração (mM) do LI, confirmando-se, de acordo com a literatura [58], que para comprimentos de cadeia  $n \geq 8$  estes LIs se comportam como surfactantes. De forma ilustrativa, a condutividade específica (K) versus concentração (mM) da solução

aquosa de [Ch]C<sub>8</sub> encontra-se apresentada na Figura 10. Para quase todos surfactantes em solução aquosa, existe uma mudança substancial do declive no início da agregação [59]. A descontinuidade entre os dois declives das funções lineares indica a CMC [59]. A condutividade abaixo da CMC deve-se à soma das contribuições dos íões livres (os monómeros do surfactante comportam-se como eletrólitos fortes), enquanto que acima da CMC, o aumento da condutividade em função da concentração é menor porque as micelas possuem uma mobilidade inferior do que os íões livres [59,60].

Os valores de CMC obtidos a partir das medições de condutividade encontra-se resumidos na Tabela 7.



**Figura 10** - Variação da condutividade específica (K) em função da concentração do [Ch]C<sub>8</sub> a 308,15 K.

**Tabela 7** - Valores das CMC reportados na literatura e/ou obtidos experimentalmente para os alcanoatos de colínio ([Ch][C<sub>n</sub>]) e cloretos de imidazólio ([C<sub>n</sub>mim]Cl).

LIs	CMC (mM)	
	Valores experimentais	Valores da literatura
[Ch]C <sub>8</sub>	300,3	383,0 [58]
[Ch]C <sub>10</sub>	104,3	103,3 [58]
[Ch]C <sub>12</sub>	25,8	Não disponível
[Ch]C <sub>14</sub>	7,1	Não disponível
[C <sub>8</sub> mim]Cl	Não determinado	200 [59]
[C <sub>10</sub> mim]Cl	Não determinado	62 [59]
[C <sub>12</sub> mim]Cl	Não determinado	14 [59]
[C <sub>14</sub> mim]Cl	Não determinado	3,8 [59]

Analisando a Tabela 7, observou-se que os valores de CMC diminuem significativamente com o aumento do comprimento da cadeia alquílica do catião do LI. Este resultado é

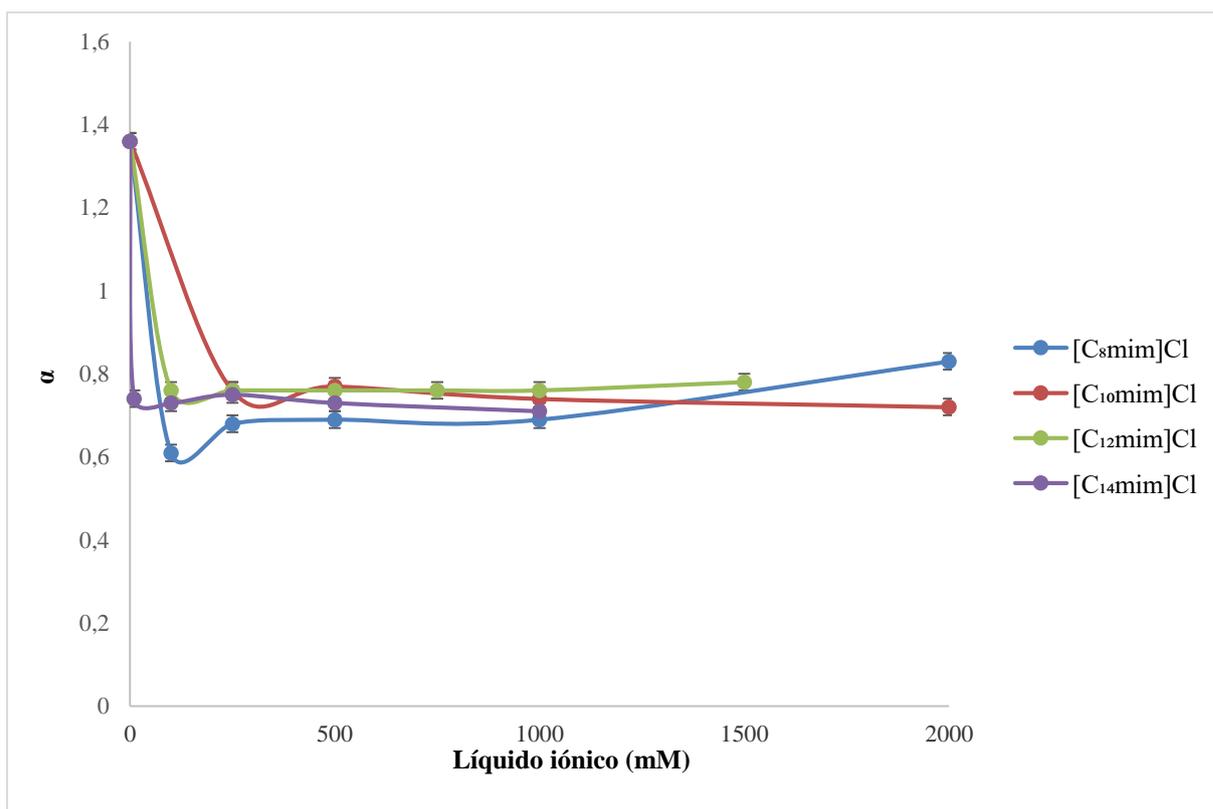
esperado uma vez que, quanto maior for a cadeia hidrofóbica maior é a tendência para a organização das moléculas em água, promovendo mais rapidamente a sua associação e a formação de micelas.

### **3.4 - Determinação dos parâmetros solvatocrômicos das soluções aquosas de LIs**

#### **3.4.1 - Determinação dos parâmetros solvatocrômicos das soluções aquosas de cloretos de imidazólios**

Os parâmetros solvatocrômicos permitem inferir acerca da polaridade do solvente e prever qual será o melhor LI e a sua respetiva concentração para a extração de um determinado soluto. Os parâmetros solvatocrômicos de soluções aquosas de LIs não se encontram reportados na literatura. Os valores dos parâmetros solvatocrômicos foram determinados experimentalmente, exceto os valores dos LIs puros que foram obtidos pelo modelo preditivo COSMO-RS e de acordo com a literatura [47,51]. Os parâmetros solvatocrômicos não foram determinado para os LIs puros porque o  $[C_8mim]Cl$  e o  $[C_{10}mim]Cl$  são extremamente viscosos, enquanto que o  $[C_{12}mim]Cl$  e o  $[C_{14}mim]Cl$  são sólidos à temperatura ambiente.

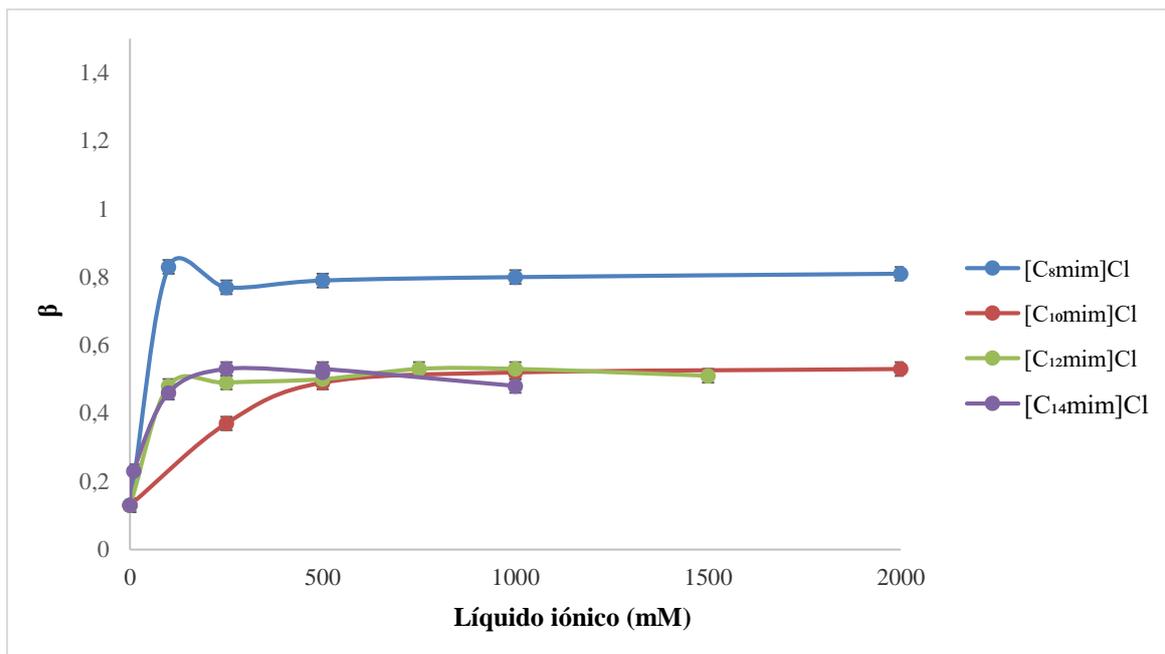
Na Figura 11 estão apresentados os valores do parâmetro  $\alpha$  obtido a diferentes concentrações das respetivas soluções aquosas de cloretos de imidazólio.



**Figura 11** - Efeito da concentração das soluções aquosas de  $[C_n\text{mim}]\text{Cl}$  no parâmetro  $\alpha$ .

Analisando a Figura 11 verifica-se uma diminuição rápida da capacidade do solvente (água) para doar prótons com o aumento da concentração dos LIs do tipo  $[C_n\text{mim}]\text{Cl}$ , para concentrações inferiores à CMC, tendendo posteriormente para um valor constante. As soluções aquosas de  $[C_8\text{mim}]\text{Cl}$  apresentam valores inferiores de parâmetro  $\alpha$  relativamente aos restantes LIs (até 1000 mM), indicando que estas soluções apresentam uma menor acidez. No entanto, as soluções de  $[C_n\text{mim}]\text{Cl}$ , com  $n = 10, 12$  e  $14$ , apresentam valores semelhantes de  $\alpha$  para concentrações superiores a 500 mM. Perante as concentrações mais elevadas e na presença de micelas não há alterações significativas do parâmetro  $\alpha$ , indicando que as interações por pontes de hidrogénio não se alteram significativamente após a CMC e sendo semelhante para todos os LIs

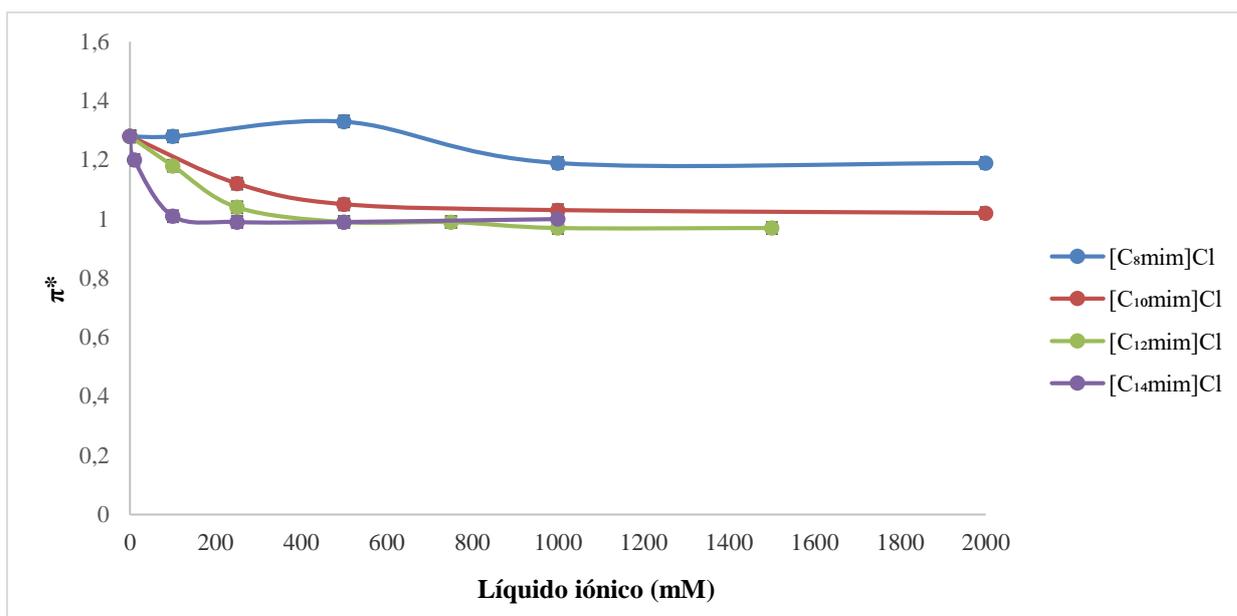
Os resultados para parâmetro  $\beta$  encontram-se na Figura 12.



**Figura 12** - Efeito da concentração das soluções aquosas de  $[C_n\text{mim}]\text{Cl}$  no parâmetro  $\beta$ .

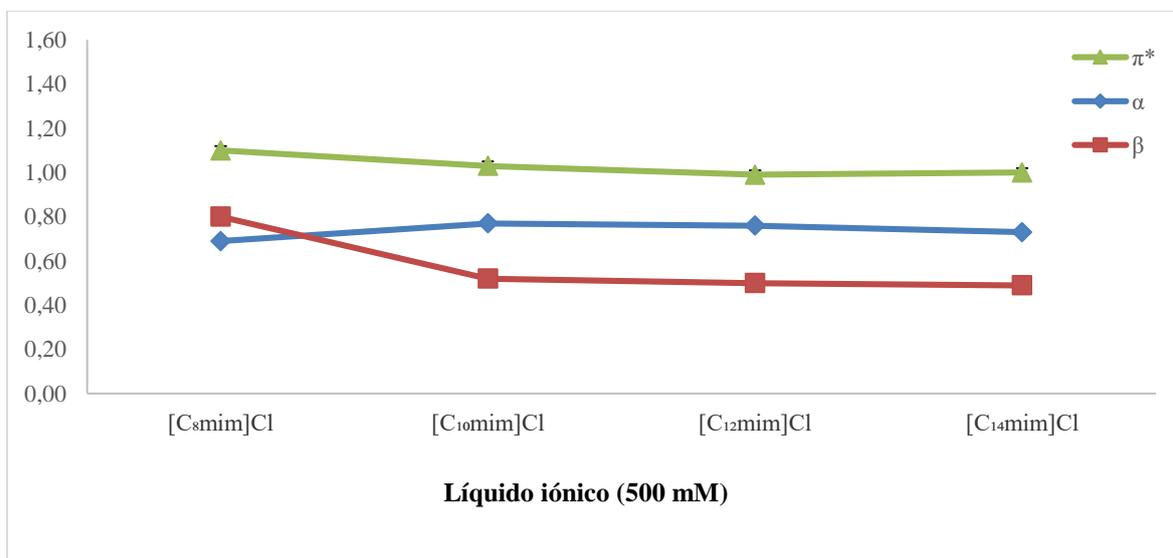
Pela análise da Figura 12, verifica-se um aumento da capacidade do solvente (água) para aceitar prótons quando se adiciona o LI. O  $[C_8\text{mim}]\text{Cl}$  apresenta valores de  $\beta$  superiores aos restantes, sendo que os restantes  $[C_n\text{mim}]\text{Cl}$ , com  $n = 10, 12$  e  $14$ , apresentam valores semelhantes para as concentrações de LI superiores a  $500$  mM. A concentrações mais elevadas e na presença de micelas não há alterações significativas no parâmetro  $\beta$ , indo de encontro ao observado com o parâmetro  $\alpha$ .

Os dados obtidos para o parâmetro  $\pi^*$  (Figura 13), demonstram que a polarizabilidade das soluções aquosas de LI diminui ligeiramente com a concentração do LI, e mantendo-se constante para concentrações acima da CMC. Para além do mais, a polarizabilidade do solvente é tanto menor quanto maior for a cadeia alquílica do LI.



**Figura 13** - Efeito da concentração das soluções aquosas de  $[C_n\text{mim}]\text{Cl}$  no parâmetro  $\pi^*$ .

Analisando os resultados anteriores e de acordo com os resultados da Figura 14, conclui-se que os parâmetros  $\beta$  e  $\alpha$  não variam significativamente para os vários LIs puros, sendo que apenas se observam diferenças mais significativas para soluções aquosas abaixo da CMC de cada LI.



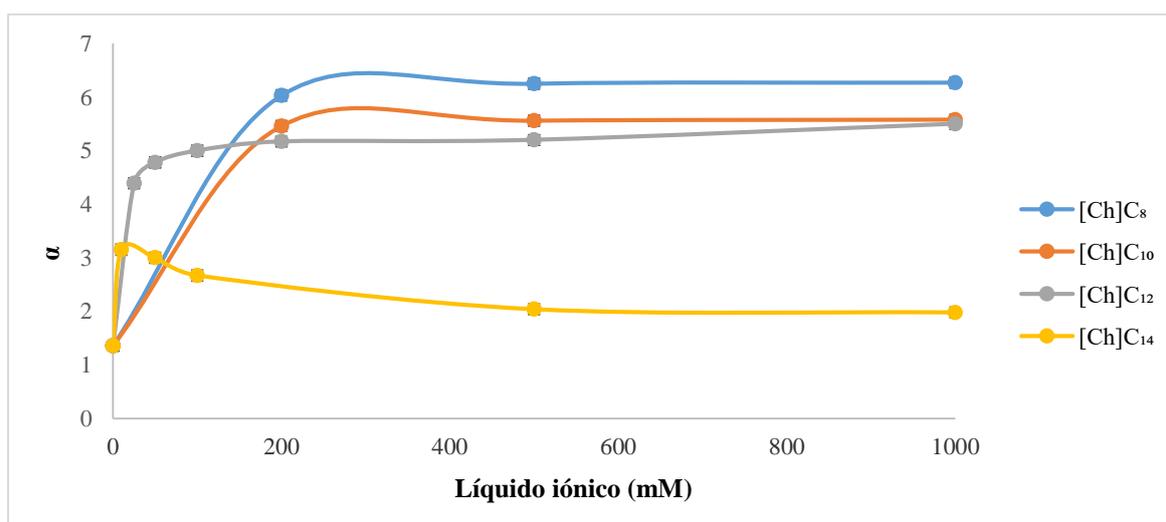
**Figura 14** - Efeito do comprimento da cadeia alquílica das soluções aquosas dos diferentes LIs  $[C_n\text{mim}]\text{Cl}$  (500mM) na variação dos parâmetros solvatocrômicos.

Analisando a Figura 14, verifica-se que o parâmetro  $\alpha$  passa por um ligeiro máximo com o aumento da cadeia alquílica do LI, enquanto os parâmetros  $\beta$  e  $\pi^*$  diminuem com o aumento da cadeia alquílica de forma mais pronunciada para as cadeias alquílicas menores, sendo que atingem um patamar para cadeias mais longas.

Apesar da diminuição do parâmetro  $\beta$  poder indicar que as ligações por pontes de hidrogénio com a água poderiam ser relevantes, os valores constantes entre o [C<sub>10</sub>mim]Cl e o [C<sub>14</sub>mim]Cl permitem descartar essa hipótese, e tal como se verificará de seguida com os resultados de extração da cinaropricina. A extração da cinaropricina não depende principalmente da possibilidade de estabelecer pontes de hidrogénios com os vários grupos –OH ou =O, mas sim da capacidade que o LI possui para formar micelas, tendo a capacidade de incorporar o composto alvo no seu interior (dado que os melhores resultados em termos de rendimento de extração foram obtidos com o LI que apresenta uma menor CMC, [C<sub>14</sub>mim]Cl).

### 3.4.2 - Determinação dos parâmetros solvatocrómicos das soluções aquosas dos alcanosatos de colínio

Foram determinados os parâmetros solvatocrómicos para soluções aquosas de [Ch]C<sub>n</sub>, com  $n = 8, 10, 12$  e  $14$ , cujos resultados para o parâmetro  $\alpha$  em função da concentração do LI estão apresentados na Figura 15.

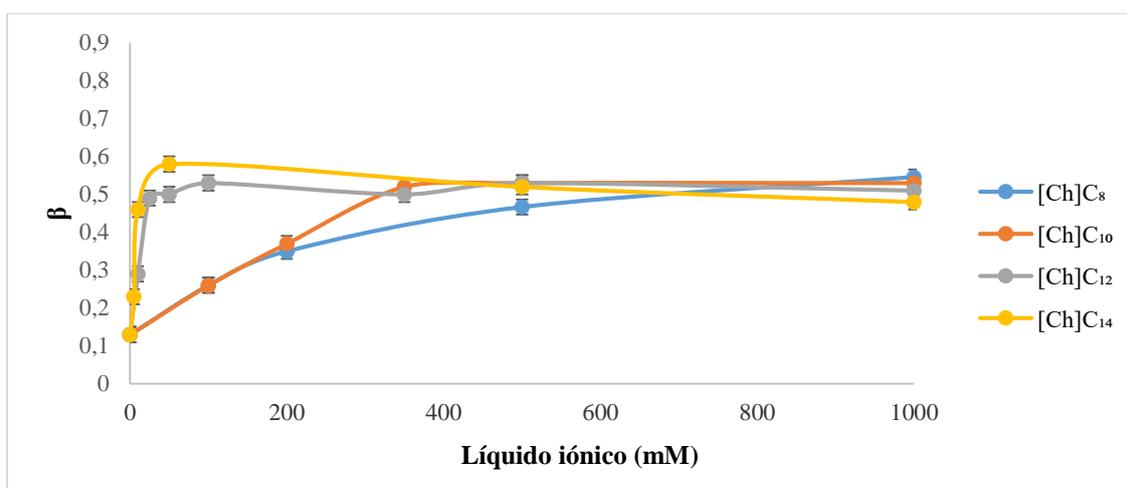


**Figura 15** - Efeito da concentração das soluções aquosas de [Ch]C<sub>n</sub> no parâmetro  $\alpha$ .

Analisando a Figura 15, é observado um aumento da capacidade do solvente (água) em doar prótons quando se aumenta a concentração do LI. Este efeito é contrário ao

observado com soluções aquosas de  $[C_n\text{mim}]\text{Cl}$ , indicando que misturas de água e cloretos de colínio apresentam uma maior capacidade para estabelecer pontes de hidrogénio com um determinado soluto. Tal como com os cloretos de imidazólio, o parâmetro  $\alpha$  é praticamente constante para concentrações de LI acima da CMC. As soluções aquosas de  $[\text{Ch}]C_{14}$  apresentam valores de  $\alpha$  inferiores às restantes soluções de LIs e com um decréscimo acentuado a partir dos 100 mM.

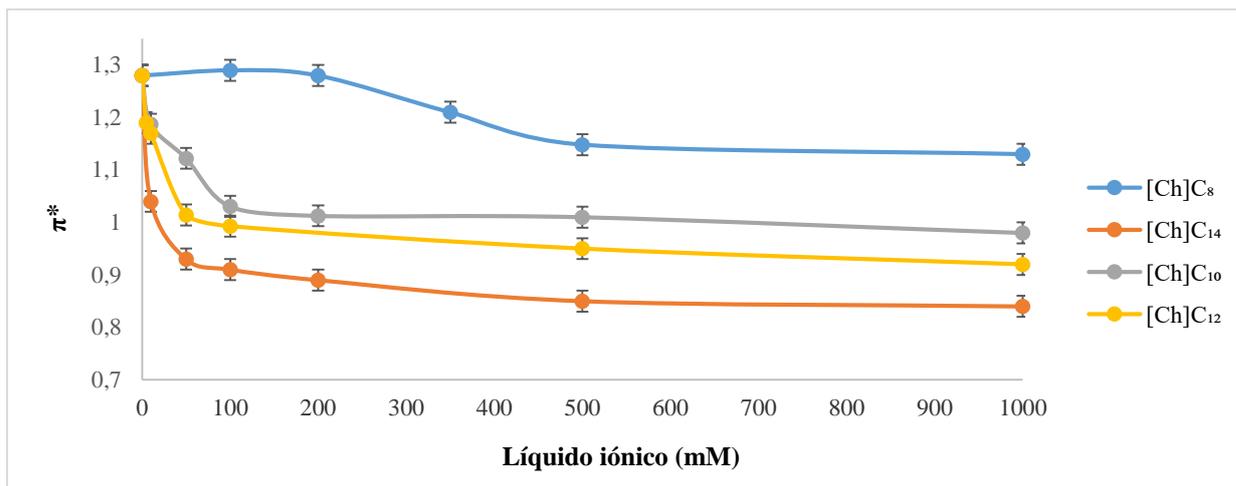
Após o estudo do parâmetro  $\alpha$  procedeu-se ao estudo do parâmetro  $\beta$  que se encontra representado na Figura 16.



**Figura 16** - Efeito da concentração das soluções aquosas de  $[\text{Ch}]C_n$  no parâmetro  $\beta$ .

Analisando a Figura 16, verifica-se que há um aumento da capacidade do solvente (água) para aceitar prótons quando se adiciona LI, e indo de encontro aos resultados obtidos com os cloretos de imidazólio. A partir dos 500 mM os valores do parâmetro  $\beta$  não sofrem alterações significativas. A partir de 500 mM as soluções aquosas de todos os  $[\text{Ch}]C_n$  estudados tendem a ter valores semelhantes.

Por fim estudou-se o parâmetro  $\pi^*$ , e cujos valores obtidos se encontram apresentados na Figura 17.



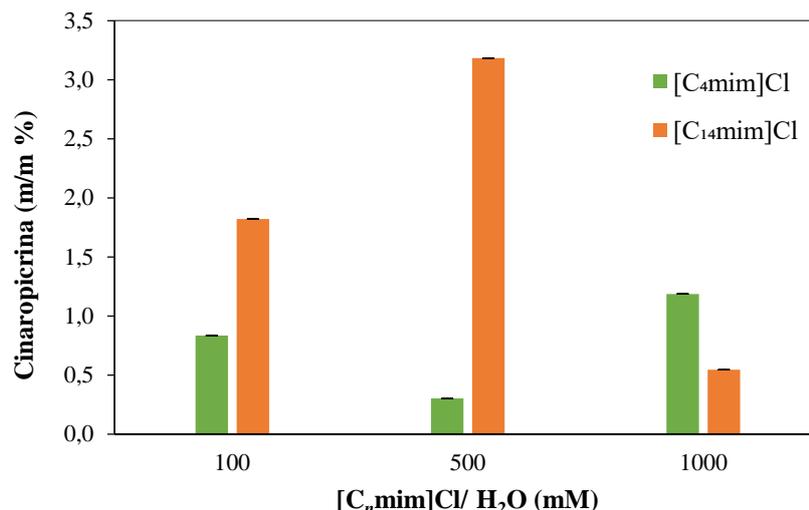
**Figura 17** - Efeito da concentração das soluções aquosas de LIs do tipo  $[Ch]C_n$  no parâmetro  $\pi^*$ .

Analisando a Figura 17, verifica-se que a polarizabilidade das soluções aquosas diminui com a adição de LI. A polarizabilidade também diminui com o aumento da cadeia carboxílica do LI, observando-se neste caso um efeito muito mais pronunciado do que no caso dos  $[C_n\text{mim}]Cl$ .

De acordo com os resultados anteriores verifica-se que os  $[Ch]C_n$  apresentam uma maior capacidade para alterar a capacidade de soluções aquosas para estabelecer pontes de hidrogénio. No entanto, e dado que as soluções aquosas de  $[Ch]C_n$  não foram as mais promissoras para a extração da cinaropricina face às soluções de cloretos de imidazólio, tal como se verificará mais à frente, estes resultados indicam que a extração da cinaropricina não é dominada pela capacidade do solvente para estabelecer pontes de hidrogénio.

### 3.5 – Extração da cinaropricina a partir das folhas de *C. cardunculus* L. usando soluções aquosas de líquidos iónicos

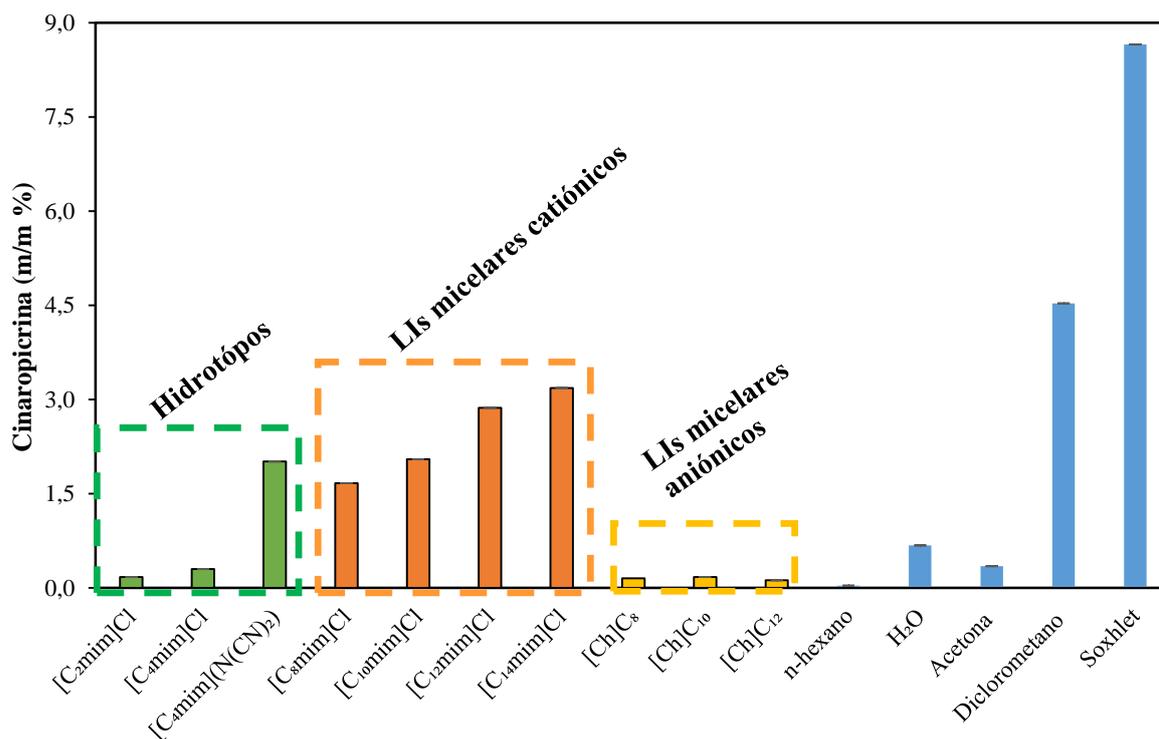
Realizaram-se primeiramente ensaios de extração de cinaropricina com soluções aquosas de LIs hidrotrópos e micelares (Figura 18) de modo a inferir acerca das características mais promissoras para a extração do composto alvo. Note-se que compostos hidrotrópos apresentam a capacidade de formar agregados com o soluto e por conseguinte podem conduzir a um aumento da sua solubilidade e consequentemente da eficiência de extração [50]. Testaram-se soluções aquosas de  $[C_4\text{mim}]Cl$  e  $[C_{14}\text{mim}]Cl$  com diferentes concentrações, nas seguintes condições de extração: razão sólido-líquido ( $R_{S/L}$ )= 1:10, durante 2h a 25°C.



**Figura 18** - Influência do carácter hidrotrópo e micelar do líquido iónico na extração da cinaropicrina. Condições de extração: T=25°C, R<sub>(S/L)</sub>=1:10, t=2h.

É possível verificar (Figura 18) que as soluções aquosas de [C<sub>14</sub>mim]Cl permitem rendimentos de extração de cinaropicrina mais elevados do que os obtidos com as soluções aquosas de [C<sub>4</sub>mim]Cl. De acordo com estes resultados, é possível afirmar que as soluções aquosas de LIs com comportamento micelar são melhores solventes para a extração da cinaropicrina, sendo ainda que o aumento da sua concentração promove um rendimento de extração mais elevado.

Dos resultados anteriores observou-se que a concentração de LI mais indicada é a de 500 mM. Deste modo, testou-se posteriormente o efeito da estrutura química dos diferentes LIs a uma concentração de 500 mM, e avaliou-se a extração com solventes orgânicos convencionais e água nas mesmas condições de extração descritas anteriormente, e também uma extração com diclorometano em *Soxhlet* (Figura 19).



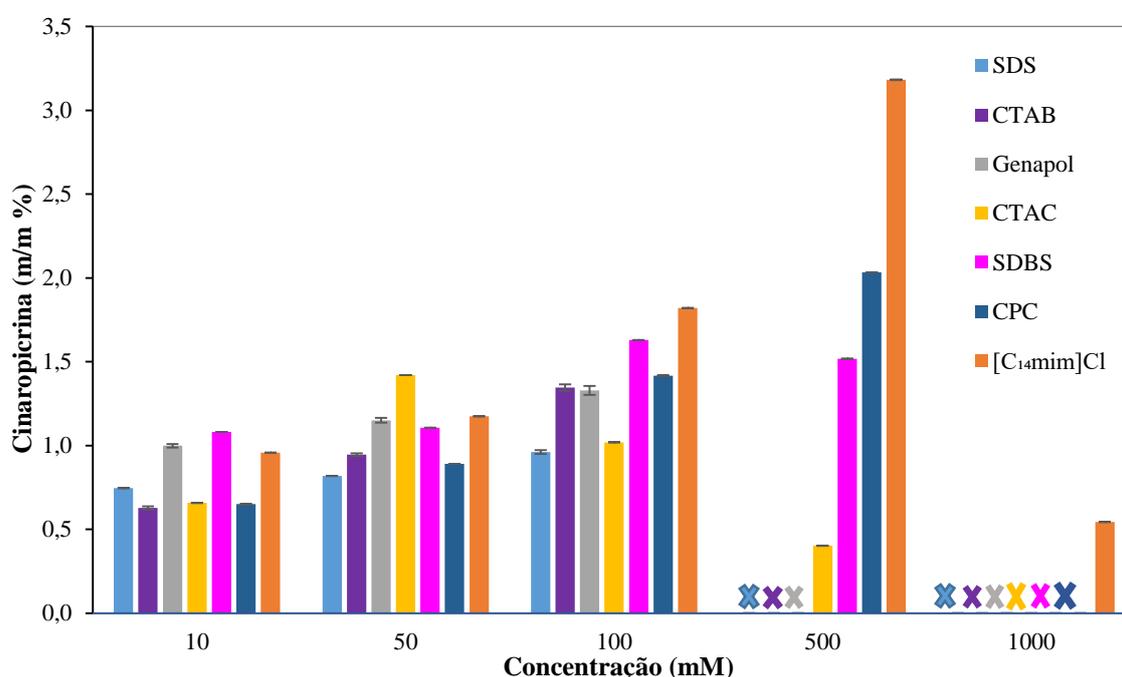
**Figura 19** - Efeito da estrutura química dos LIs no rendimento de extração da cinaropicrina e solventes convencionais (condições de extração  $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $R_{(S/L)}= 1:10$ ,  $t=2\text{h}$ ,  $C=500\text{mM}$ ).

A partir da Figura 19, verifica-se que as folhas de cardo estudadas possuem cerca de 8,65 m/m % de cinaropicrina como se pode observar pelos resultados obtidos com diclorometano e uma extração em *Soxhlet*. O estudo dos diferentes LIs revela novamente que os LIs com capacidade para formar micelas são mais promissores para a extração da cinaropicrina. Entre os LIs micelares, os LIs micelares catiónicos ( $[\text{C}_n\text{mim}]\text{Cl}$ ) conduzem a um melhor rendimento de extração comparando com os LIs micelares aniônicos ( $[\text{Ch}]\text{C}_n$ ). Note-se inclusive que soluções aquosas de  $[\text{Ch}]\text{C}_n$  levam a rendimentos de extração inferiores aos obtidos com água. Por fim, os rendimentos de extração são tanto mais elevados quanto maior o comprimento da cadeia alquílica do catião.

Finalmente, é importante referir que as soluções aquosas de  $[\text{C}_n\text{mim}]\text{Cl}$  permitiram obter rendimentos de extração de cinaropicrina superiores aos obtidos com água ou acetona (Figura 19), mas inferiores aos obtidos por maceração ou extração em *Soxhlet* com diclorometano. Assim, as soluções aquosas dos LIs da família dos  $[\text{C}_n\text{mim}]\text{Cl}$ , surgem como solventes promissores para a extração de cinaropicrina das folhas do cardo. Dentro dos LIs micelares catiónicos, o LI que conduz a melhores rendimentos é o  $[\text{C}_{14}\text{mim}]\text{Cl}$  (3,18 m/m %).

### 3.6 – Extração da cinaropicrina com surfactantes convencionais comparando com [C<sub>14</sub>mim]Cl

De forma a complementar os dados obtidos anteriormente, testaram-se soluções aquosas de seis surfactantes convencionais, catiónicos, aniónicos e não iónicos, e com ou sem os anéis aromáticos, de modo a inferir sobre os mecanismos de extração. Na Figura 20 estão apresentados os rendimentos de extração da cinaropicrina com os seis surfactantes estudados e com a melhor solução aquosa de LI ([C<sub>14</sub>mim]Cl), com as respetivas concentrações: 10, 50, 100, 500 e 1000 mM.



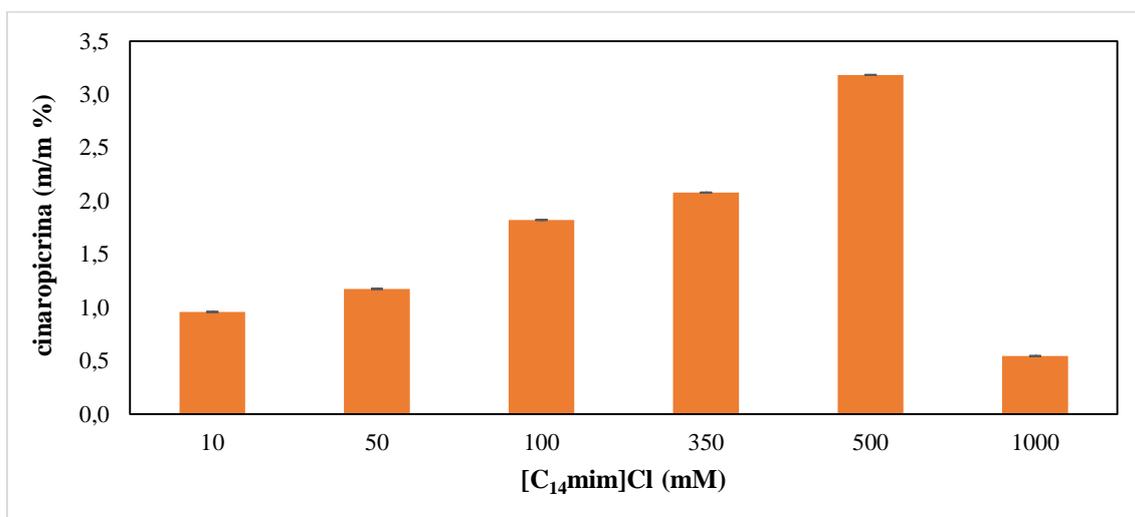
**Figura 20** - Efeito dos surfactantes convencionais a diferentes concentrações comparando com solução aquosa de [C<sub>14</sub>mim]Cl. Condições de extração: T=25°C, R<sub>(S/L)</sub>=1:10, t=2h.

De uma forma geral, conforme os resultados apresentados na Figura 20, as soluções aquosas de [C<sub>14</sub>mim]Cl permitem obter maiores rendimentos de extração do que os surfactantes convencionais para as concentrações de 100 e 500 mM. Conclui-se que a solução aquosa de [C<sub>14</sub>mim]Cl prevalece como a melhor solução para extrair o composto de interesse. Os resultados obtidos com SDS confirmam que os surfactantes aniónicos são solventes menos promissores para a extração de cinaropicrina, indo de encontro ao obtido com a série de LIs [Ch]C<sub>n</sub>, e que a presença de anéis aromáticos no catião ou anião é favorável para a extração dado que os surfactante convencionais CPC e SDBS se encontram entre os melhores surfactantes estudados. O “x” representado na Figura 20

significa que não foi possível efectuar a extração da cinaropicrina nas respectivas concentrações porque os surfactantes convencionais apresentam solubilidades baixas em água. Devido às suas baixas solubilidades dos surfactantes convencionais em água é possível usar concentrações mais elevadas o  $[C_{14}mim]Cl$ .

### 3.7 – Otimização das condições de extração da cinaropicrina com soluções aquosas de LI

Com o objetivo de otimizar os rendimentos de extração da cinaropicrina, e utilizando soluções aquosas de  $[C_{14}mim]Cl$ , foi otimizada a concentração do LI (mM), a temperatura, tempo de extração e a razão sólido-líquido. Em primeiro lugar, estudou-se a influência da concentração da solução aquosa de  $[C_{14}mim]Cl$  na eficiência de extração do composto de interesse. As concentrações testadas foram as seguintes: 10, 50, 100, 350, 500, e 1000 mM, mantendo a temperatura a 25°C durante 2h e com  $R_{(S/L)}= 1:10$  (Figura 21).

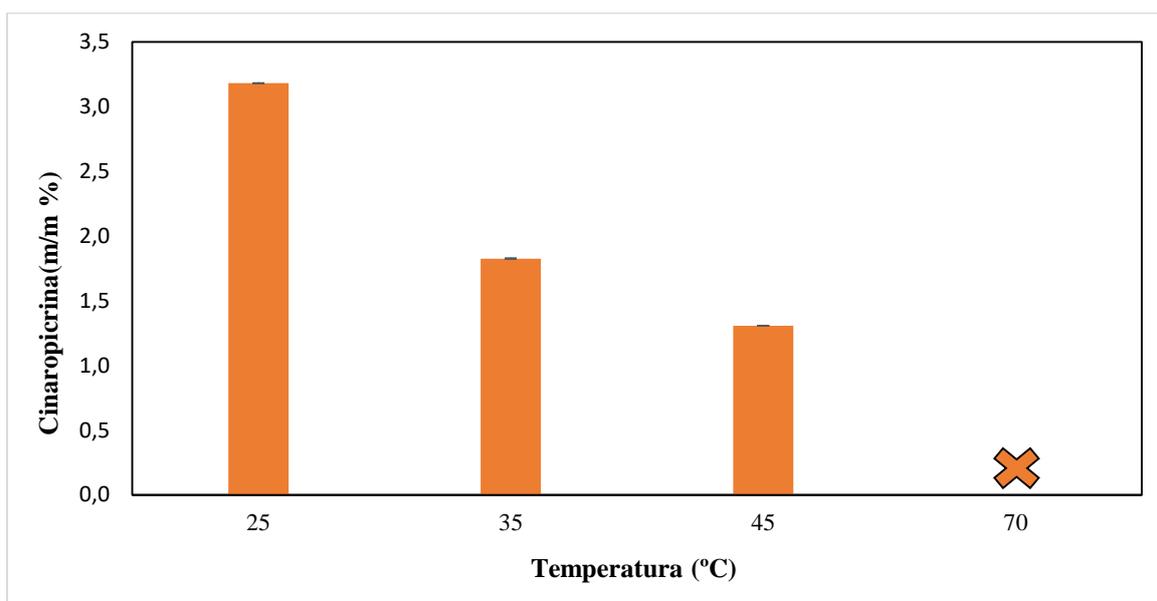


**Figura 21** - Efeito da concentração da solução aquosa de  $[C_{14}mim]Cl$  no rendimento de extração de cinaropicrina. Condições de extração:  $T=25^{\circ}C$ ,  $t=2h$ ,  $R_{(S/L)}=1:10$ .

Os resultados apresentados na Figura 21 permitem concluir que o rendimento de extração passa por um máximo, e que a concentração de 500 mM é a que conduz a uma melhor eficiência de extração. É consensual o decréscimo na eficiência de extração observada em concentrações mais elevadas de LI porque aumenta a viscosidade da solução aquosa impedindo uma boa penetração do solvente nos tecidos vegetais. Estes resultados vão de encontro à literatura onde se observa também um máximo no rendimento de extração de

outros solutos de outras matrizes de biomassa, seguido de um decréscimo, à medida que se varia a concentração do LI [61–65].

Os resultados da Figura 22 mostram o efeito da temperatura sobre o rendimento de extração, mantendo as restantes condições de extração:  $R_{(S/L)}=1:10$ , tempo de extração de 2 h, e concentração de LI de 500 mM.



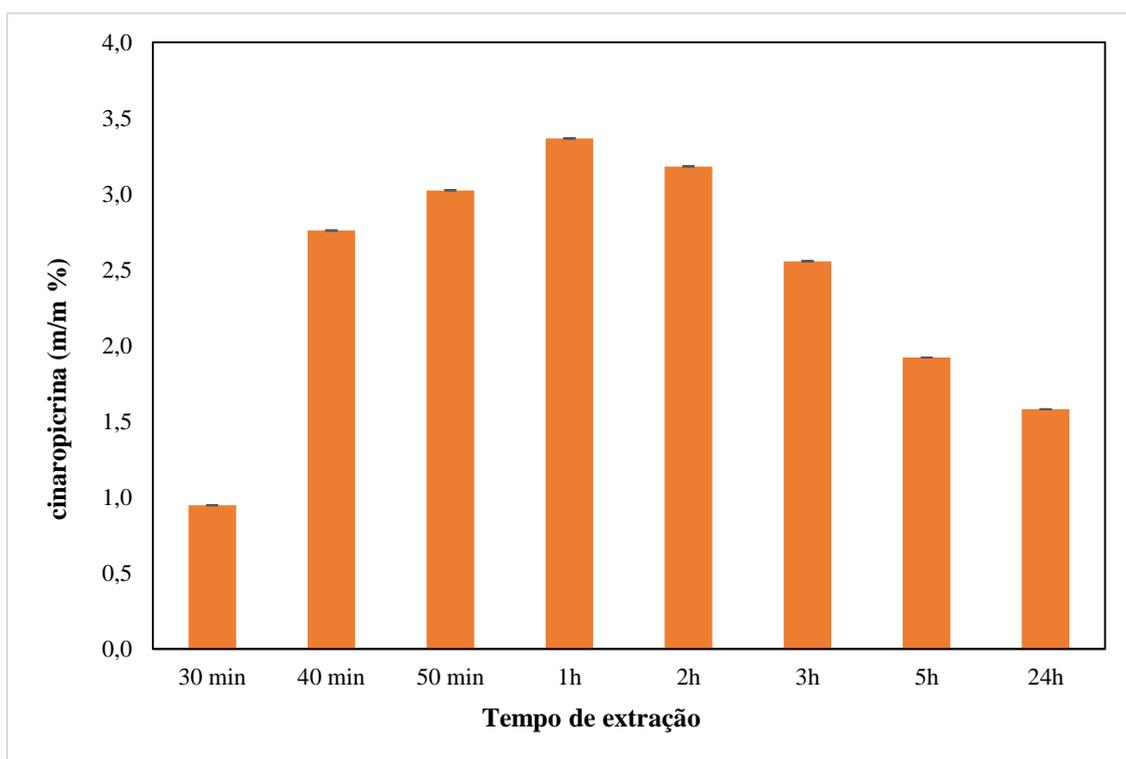
**Figura 22** - Efeito da temperatura no rendimento de extração de cinaropicrina com uma solução aquosa de 500 mM de  $[C_{14}mim]Cl$ . Condições de extração:  $t=2h$ ,  $R_{(S/L)}=1:10$ .

Embora o rendimento de extração deva ser favorecido pelo aumento da temperatura, sendo já observado em outros estudos envolvendo soluções aquosas de LIs [64], neste estudo, ao contrário do que era esperado observou-se uma diminuição do rendimento de extração com o aumento de temperatura. A diminuição do rendimento de extração deve-se a alteração da matriz celulósica que promoveu a gelificação da amostra a temperaturas mais altas. Essa gelificação encontra-se na Figura 23 quando se extraiu com a temperatura igual a  $70^{\circ}C$ , impedindo uma separação da biomassa do solvente de extração, impedindo proceder a sua quantificação. As soluções finais após a extração a temperaturas mais elevadas apresentavam elevada viscosidade, provavelmente associada à dissolução de outras frações de peso molecular mais elevado, nomeadamente de polissacarídeos [64].



**Figura 23** - Extração da cinaropicrina da folha do cardo com uma solução aquosa de 500 de mM de  $[C_{14}mim]Cl$ . Condições de extração:  $T=70^{\circ}C$   $t=2h$ ,  $R_{(S/L)}=1:10$ .

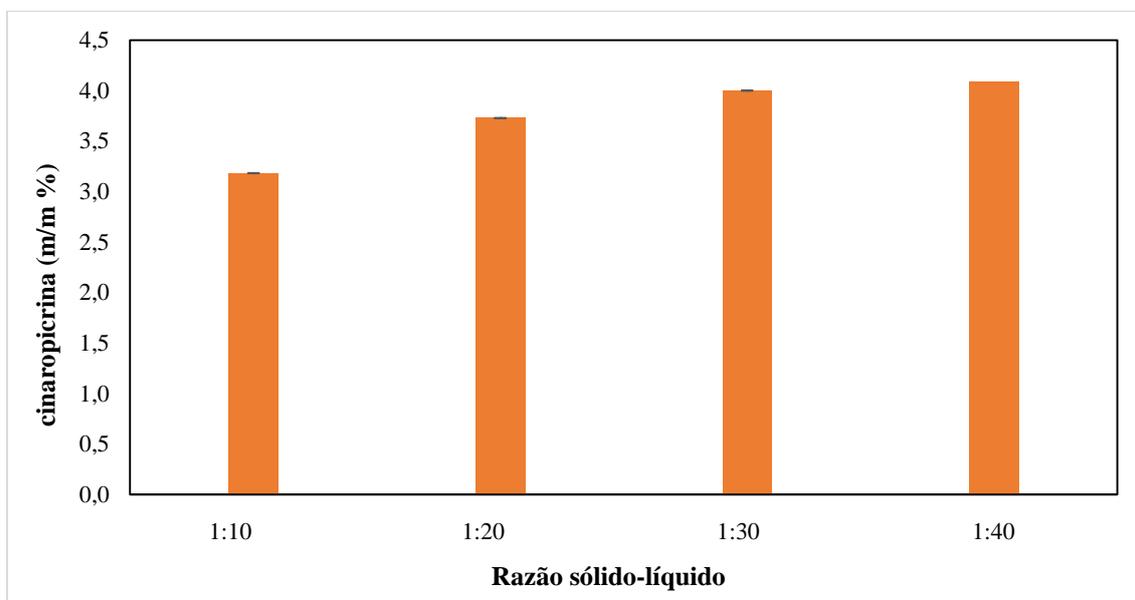
Estudou-se o efeito do tempo de extração no rendimento de cinaropicrina, sendo possível observar (Figura 24), que os melhores rendimentos são obtidos para um tempo de extração de 1h. A diminuição do rendimento para tempos de extração superiores a 1 h deverá estar associada ao mesmo fenómeno de gelificação da solução acima referido.



**Figura 24** - Efeito do tempo no rendimento de extração de cinaropicrina com uma solução aquosa de 500 mM de  $[C_{14}mim]Cl$ . Condições de extração:  $R_{(S/L)}=1:10$ ,  $T=25^{\circ}C$ .

Por fim, foi otimizada a razão sólido-líquido, cujos resultados obtidos se encontram na Figura 25. A variação mais significativa do rendimento de extração ocorre quando a razão

sólido-líquido passa de 1:10 para 1:20, atingindo 3,73 m/m%, enquanto quando passa de 1:30 para 1:40 se observa uma variação menos significativa, mas atingindo 4,09 m/m%. De um modo geral, o rendimento de extração aumenta com o aumento da razão sólido-líquido, atingindo rendimentos próximos aos obtidos por extração sólido-líquido com diclorometano, cujo rendimento foi de 4,53 m/m%.



**Figura 25** - Efeito da razão-sólido líquido no rendimento de extração de cinaropirina com uma solução aquosa de 500 mM de  $[C_{14}mim]Cl$ . Condições de extração:  $T=25^{\circ}C$ ,  $t=1h$ .



## **4 - Conclusão final**



As amostras das folhas de cardo foram devidamente caracterizadas por GC-MS, determinou-se o seu teor de humidade e verificou-se a estabilidade da cinaropirina em soluções aquosas, confirmando que não ocorre degradação da cinaropirina.

Determinaram-se os parâmetros solvatocrómicos para várias soluções aquosas de LIs permitindo confirmar os resultados obtidos experimentalmente em termos de extração da cinaropirina, onde LIs com capacidade para formar micelas são solventes mais promissores para a sua extração.

Verificou-se que as soluções aquosas de LIs micelares catiónicos, e em particular o [C<sub>14</sub>mim]Cl se apresentam como melhores solventes para extrair a cinaropirina sendo possível atingir rendimentos de 4,09 m/m%. As melhores condições de extração com o [C<sub>14</sub>mim]Cl implicam a utilização de uma razão solido-liquido 1:40 a 25 °C e durante 1 h a 500 mM. A baixa temperatura de extração, conjugada com a utilização do [C<sub>14</sub>mim]Cl em solução aquosa traduzem-se numa contribuição significativa para o desenvolvimento de tecnologias mais sustentáveis para a extração deste composto.



## **5 - Trabalho futuro**



Com o objetivo de valorizar a folha de *C. cardunculus* L. como fonte de cinaropricina seria interessante estudar no futuro:

- A saturação das soluções aquosas de LIs recorrendo a vários ciclos de extração, assim como avaliar a recuperação dos solventes de forma a garantir a sustentabilidade de todo o processo para uma aplicação de maior escala.
- Desenvolver um método de isolamento e purificação da cinaropricina a partir das soluções aquosas de LIs e avaliar a sua atividade biológica.
- Estudar um processo integrado de extração, utilizando sempre soluções aquosas de LIs, focado também em outros compostos de valor acrescentado presentes no cardo de modo a alcançar uma valorização mais eficiente desta biomassa.



## **6 - Bibliografia**



- [1] A. Rottenberg, D. Zohary, The wild ancestry of the cultivated artichoke, *Genet. Resour. Crop Evol.* 43 (1996) 53–58.
- [2] G. Sonnante, A.V. Carluccio, R. Vilatersana, D. Pignone, On the origin of artichoke and cardoon from the *Cynara* gene pool as revealed by rDNA sequence variation, *Genet. Resour. Crop Evol.* 54 (2007) 483–495.
- [3] C. Rial, P. Novaes, R.M. Varela, J.M. G. Molinillo, F. a. Macias, Phytotoxicity of Cardoon ( *Cynara cardunculus* ) Allelochemicals on Standard Target Species and Weeds, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 6699–6706.
- [4] P.A.B. Ramos, Chemical characterization and evaluation of biological activity of *Cynara cardunculus* extractable compounds, Tese de Doutorado, Universidade de Aveiro, Portugal, 2015.
- [5] J. Pissarra, C. Pereira, D.S. Da Costa, R. Figueiredo, P. Duarte, J. Teixeira, S. Pereira, From Flower to Seed Germination in *Cynara cardunculus*: A Role for Aspartic Proteinases, *Int. J. Plant Dev. Biol.* 1 (2007) 274–281.
- [6] A. Ierna, G. Mauromicale, *Cynara cardunculus* L. genotypes as a crop for energy purposes in a Mediterranean environment, *Biomass and Bioenergy.* 34 (2010) 754–760.
- [7] J. Fernández, M.D. Curt, P.L. Aguado, Industrial applications of *Cynara cardunculus* L. for energy and other uses, *Ind. Crops Prod.* 24 (2006) 222–229.
- [8] J. Gominho, J. Fernandez, H. Pereira, *Cynara cardunculus* L. — a new fibre crop for pulp and paper production, *Ind. Crops Prod.* 13 (2001) 1–10.
- [9] J. Gominho, A. Lourenço, P. Palma, M.E. Lourenço, M.D. Curt, J. Fernández, H. Pereira, Large scale cultivation of *Cynara cardunculus* L. for biomass production—A case study, *Ind. Crops Prod.* 33 (2011) 1–6.
- [10] P. Grammelis, A. Malliopoulou, P. Basinas, N.G. Danalatos, Cultivation and Characterization of *Cynara Cardunculus* for Solid Biofuels Production in the Mediterranean Region, *Int. J. Mol. Sci.* 9 (2008) 1241–1258.
- [11] P.A.B. Ramos, S.A.O. Santos, Â.R. Guerra, O. Guerreiro, C.S.R. Freire, S.M. Rocha, M.F. Duarte, A.J.D. Silvestre, Phenolic composition and antioxidant

- activity of different morphological parts of *Cynara cardunculus* L. var. *altilis* (DC), Ind. Crops Prod. 61 (2014) 460–471.
- [12] E. Miadokova, S. Nadova, V. Vlckova, V. Duhova, M. Kopaskova, L. Cipak, P. Rauko, P. Mucaji, D. Grancai, Antigenotoxic effect of extract from *Cynara cardunculus* L., Phyther. Res. 22 (2008) 77–81.
- [13] E. Christaki, E. Bonos, P. Florou-Paneri, Nutritional And Functional Properties of *Cynara* Crops (Globe Artichoke and Cardoon) and Their Potential Applications: A Review, Int. J. Appl. Sci. Technol. 2 (2012) 64–70.
- [14] K. Eljounaidi, C. Comino, A. Moglia, K. Cankar, A. Genre, A. Hehn, F. Bourgaud, J. Beekwilder, S. Lanteri, Accumulation of cynaropicrin in globe artichoke and localization of enzymes involved in its biosynthesis, Plant Sci. 239 (2015) 128–136.
- [15] P.A.B. Ramos, Â.R. Guerra, O. Guerreiro, C.S.R. Freire, A.M.S. Silva, M.F. Duarte, A.J.D. Silvestre, Lipophilic Extracts of *Cynara cardunculus* L. var. *altilis* (DC): A Source of Valuable Bioactive Terpenic Compounds, J. Agric. Food Chem. 61 (2013) 8420–8429.
- [16] A. Ghantous, H. Gali-Muhtasib, H. Vuorela, N.A. Saliba, N. Darwiche, What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials?, Drug Discov. Today. 15 (2010) 668–678.
- [17] K. Thiele, H.O. Bernhard, U.S. Patent 4133903, 1979.
- [18] Extrasynthese- The free the chemistry of plants database, 2015 <http://www.extrasynthese.com/products-catalog/sesquiterpene/cynaropicrin-p7689406-c3808-s.html> (accessed October 1, 2015).
- [19] X. Zhu, H. Zhang, R. Lo, Phenolic Compounds from the Leaf Extract of Artichoke ( *Cynara scolymus* L.) and Their Antimicrobial Activities, J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 7272–7278.
- [20] H. Falleh, R. Ksouri, K. Chaieb, N. Karray-Bouraoui, N. Trabelsi, M. Boulaaba, C. Abdelly, Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities, C. R. Biol. 331 (2008) 372–379.
- [21] M.M. Pandey, S. Rastogi, A.K.S. Rawat, *Saussurea costus*: Botanical, chemical

- and pharmacological review of an ayurvedic medicinal plant, *J. Ethnopharmacol.* 110 (2007) 379–390.
- [22] A.J.B. Hay, M. Hamburger, K. Hostettmann, J.R.S. Hoult, Toxic inhibition of smooth muscle contractility by plant-derived sesquiterpenes caused by their chemically reactive  $\alpha$ -methylenebutyrolactone functions, *Br. J. Pharmacol.* 112 (1994) 9–12.
- [23] S. Wagner, A. Hofmann, B. Siedle, L. Terfloth, I. Merfort, J. Gasteiger, Development of a Structural Model for NF- $\kappa$ B Inhibition of Sesquiterpene Lactones Using Self-Organizing Neural Networks, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 2241–2252.
- [24] T. Minami, K. Hirakawa, S. Koyanagi, S. Nakamura, M. Yamaguchi, A new synthesis of  $\alpha$ -methylene lactones, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* (1990) 2385–2390.
- [25] J.Y. Cho, K.U. Baik, J.H. Jung, M.H. Park, In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from *Saussurea lappa*, *Eur. J. Pharmacol.* 398 (2000) 399–407.
- [26] J. Dai, R.J. Mumper, Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties, *Molecules.* 15 (2010) 7313–7352.
- [27] C.S.R. Freire, *Eucalyptus globulus* low molecular weight organic compounds: behaviour during wood kraft pulping and pulp bleaching, Tese de Doutoramento, Universidade de Aveiro, Portugal, 2003.
- [28] J. Azmir, I.S.M. Zaidul, M.M. Rahman, K.M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M.H.A. Jahurul, K. Ghafoor, N.A.N. Norulaini, A.K.M. Omar, Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *J. Food Eng.* 117 (2013) 426–436.
- [29] E. Uribe, A. Delgadillo, C. Giovagnoli-Vicuña, I. Quispe-Fuentes, L. Zura-Bravo, Extraction Techniques for Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity Determination of Chilean Papaya ( *Vasconcellea pubescens* ) Fruit, *J. Chem.* 2015 (2015) 1–8.
- [30] S.A.O. Santos, Phenolic compounds from forest industrial by-products, Tese de Doutoramento, Universidade de Aveiro, Portugal, 2012.

- [31] H. Passos, M.G. Freire, J.A.P. Coutinho, Ionic liquid solutions as extractive solvents for value-added compounds from biomass, *Green Chem.* 16 (2014) 4786–4815.
- [32] N. Sánchez Ávila, F. Priego Capote, M.D. Luque de Castro, Ultrasound-assisted extraction and silylation prior to gas chromatography–mass spectrometry for the characterization of the triterpenic fraction in olive leaves, *J. Chromatogr. A.* 1165 (2007) 158–165.
- [33] Y. Dai, G. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus tinctorius* L., *Anal. Chem.* 85 (2013) 6272–6278.
- [34] M. Durante, M. Lenucci, G. Mita, Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Carotenoids from Pumpkin (*Cucurbita* spp.): A Review, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 6725–6740.
- [35] H. Shimoda, K. Ninomiya, N. Nishida, T. Yoshino, T. Morikawa, H. Matsuda, M. Yoshikawa, Anti-Hyperlipidemic sesquiterpenes and new sesquiterpene glycosides from the leaves of artichoke (*Cynara scolymus* L.): structure requirement and mode of action, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 (2003) 223–228.
- [36] T. Akihisa, K. Yasukawa, H. Oinuma, Y. Kasahara, S. Yamanouchi, M. Takido, K. Kumaki, T. Tamura, Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects, *Phytochemistry.* 43 (1996) 1255–1260.
- [37] V.F. Noldin, V. Cechinel Filho, F.D. Monache, J.C. Benassi, I.L. Christmann, R.C. Pedrosa, R.A. Yunes, Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil, *Quim. Nova.* 26 (2003) 331–334.
- [38] N. V Plechkova, K.R. Seddon, Applications of ionic liquids in the chemical industry, *Chem. Soc. Rev.* 37 (2008) 123–150.
- [39] J.I. Santos, A.M.M. Gonçalves, J.L. Pereira, B.F.H.T. Figueiredo, F.A. e Silva, J.A.P. Coutinho, S.P.M. Ventura, F. Gonçalves, Environmental safety of cholinium-based ionic liquids: assessing structure–ecotoxicity relationships, *Green Chem.* 17 (2015) 4657–4668.
- [40] M. Królikowska, K. Padaszyński, M. Królikowski, P. Lipiński, J. Antonowicz,

- Vapor–Liquid Phase Equilibria and Excess Thermal Properties of Binary Mixtures of Ethylsulfate-Based Ionic Liquids with Water: New Experimental Data, Correlations, and Predictions, *Ind. Eng. Chem. Res.* 53 (2014) 18316–18325.
- [41] T. Liu, X. Sui, R. Zhang, L. Yang, Y. Zu, L. Zhang, Y. Zhang, Z. Zhang, Application of ionic liquids based microwave-assisted simultaneous extraction of carnosic acid, rosmarinic acid and essential oil from *Rosmarinus officinalis*, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 8480–8489.
- [42] S.P.M. Ventura, A.M.M. Gonçalves, T. Sintra, J.L. Pereira, F. Gonçalves, J.A.P. Coutinho, Designing ionic liquids: the chemical structure role in the toxicity, *Ecotoxicology.* 22 (2013) 1–12.
- [43] M.G. Bogdanov, *Alternative Solvents for Natural Products Extraction*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2014.
- [44] M.J. Earle, J.M.S.S. Esperança, M.A. Gilea, J.N. Canongia Lopes, L.P.N. Rebelo, J.W. Magee, K.R. Seddon, J.A. Widegren, The distillation and volatility of ionic liquids, *Nature.* 439 (2006) 831–834.
- [45] A.F.M. Cláudio, A.M. Ferreira, S. Shahriari, M.G. Freire, J.A.P. Coutinho, Critical Assessment of the Formation of Ionic-Liquid-Based Aqueous Two-Phase Systems in Acidic Media, *J. Phys. Chem. B.* 115 (2011) 11145–11153.
- [46] R. G., N. Gathergoo, *Safer and Greener Catalysts – Design of High Performance, Biodegradable and Low Toxicity Ionic Liquids*, in: *Ion. Liq. - New Asp. Futur.*, InTech, 2013.
- [47] A.F.M. Cláudio, L. Swift, J.P. Hallett, T. Welton, J. a P. Coutinho, M.G. Freire, Extended scale for the hydrogen-bond basicity of ionic liquids, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014) 6593.
- [48] M. Blesic, M.H. Marques, N. V. Plechkova, K.R. Seddon, L.P.N. Rebelo, A. Lopes, Self-aggregation of ionic liquids: micelle formation in aqueous solution, *Green Chem.* 9 (2007) 481.
- [49] C. Jungnickel, J. Łuczak, J. Ranke, J.F. Fernández, A. Müller, J. Thöming, Micelle formation of imidazolium ionic liquids in aqueous solution, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 316 (2008) 278–284.

- [50] A.F.M. Cláudio, M.C. Neves, K. Shimizu, J.N. Canongia Lopes, M.G. Freire, J.A.P. Coutinho, The magic of aqueous solutions of ionic liquids: ionic liquids as a powerful class of cationic hydrotropes, *Green Chem.* 17 (2015) 3948–3963.
- [51] K. a. Kurnia, F. Lima, A.F.M. Cláudio, J. a. P. Coutinho, M.G. Freire, Hydrogen-bond acidity of ionic liquids: an extended scale, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2015) 18980–18990.
- [52] M.A. Ab Rani, A. Brant, L. Crowhurst, A. Dolan, M. Lui, N.H. Hassan, J.P. Hallett, P. a Hunt, H. Niedermeyer, J.M. Perez-Arlandis, M. Schrems, T. Welton, R. Wilding, Understanding the polarity of ionic liquids, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 16831.
- [53] P.G. Jessop, D.A. Jessop, D. Fu, L. Phan, Solvatochromic parameters for solvents of interest in green chemistry, *Green Chem.* 14 (2012) 1245.
- [54] M.J. Kamlet, J.L.M. Abboud, M.H. Abraham, R.W. Taft, 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.* 48 (1983) 2877–2887.
- [55] J.-M. Lee, S. Ruckes, J.M. Prausnitz, Solvent Polarities and Kamlet–Taft A comprehensive collection a Pyridinium Cation, *J. Phys. Chem. B.* 112 (2008) 1473–1476.
- [56] N. Muhammad, M.I. Hossain, Z. Man, M. El-Harbawi, M.A. Bustam, Y.A. Noaman, N.B. Mohamed Alitheen, M.K. Ng, G. Hefter, C. Yin, Synthesis and Physical Properties of Choline Carboxylate Ionic Liquids, *J. Chem. Eng. Data.* 57 (2012) 2191–2196.
- [57] J. Fritsche, C. Beindorff, M. Dachtler, H. Zhang, J. Lammers, Isolation, characterization and determination of minor artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaf extract compounds, *Eur. Food Res. Technol.* 215 (2002) 149–157.
- [58] D. Rengstl, B. Kraus, M. Van Vorst, G.D. Elliott, W. Kunz, Effect of choline carboxylate ionic liquids on biological membranes, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 123 (2014) 575–581.
- [59] G. Bai, A. Lopes, M. Bastos, Thermodynamics of micellization of alkylimidazolium surfactants in aqueous solution, *J. Chem. Thermodyn.* 40 (2008)

1509–1516.

- [60] A. Dominguez, A. Fernandez, N. Gonzalez, E. Iglesias, L. Montenegro, Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques, *J. Chem. Educ.* 74 (1997) 1227.
- [61] F. Chen, K. Hou, S. Li, Y. Zu, L. Yang, Extraction and Chromatographic Determination of Shikimic Acid in Chinese Conifer Needles with 1-Benzyl-3-methylimidazolium Bromide Ionic Liquid Aqueous Solutions, *J. Anal. Methods Chem.* 2014 (2014) 1–12.
- [62] L. Yang, X. Sun, F. Yang, C. Zhao, L. Zhang, Y. Zu, Application of Ionic Liquids in the Microwave-Assisted Extraction of Proanthocyanidins from *Larix gmelini* Bark, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 5163–5178.
- [63] L. Zhang, Y. Geng, W. Duan, D. Wang, M. Fu, X. Wang, Ionic liquid-based ultrasound-assisted extraction of fangchinoline and tetrandrine from *Stephaniae tetrandrae*, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3550–3554.
- [64] A.F.M. Cláudio, A.M. Ferreira, M.G. Freire, J.A.P. Coutinho, Enhanced extraction of caffeine from guaraná seeds using aqueous solutions of ionic liquids, *Green Chem.* 15 (2013) 2002.
- [65] X. Cao, X. Ye, Y. Lu, Y. Yu, W. Mo, Ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction of piperine from white pepper, *Anal. Chim. Acta.* 640 (2009) 47–51.