UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

ISABELLE VALENTE DE OLIVEIRA

SOLVENTES EUTÉTICOS NATURAIS COMO MATERIAIS ALTERNATIVOS APLICADOS À EXTRAÇÃO DE BIOATIVOS DE MATRIZES AMAZÔNICAS

Manaus - AM
2026

ISABELLE VALENTE DE OLIVEIRA

SOLVENTES EUTÉTICOS NATURAIS COMO MATERIAIS ALTERNATIVOS APLICADOS À EXTRAÇÃO DE BIOATIVOS DE MATRIZES AMAZÔNICAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPGCEM) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) como quesito necessário para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Edgar Aparecido Sanches

Manaus - AM
Maio, 2026

© *Todos os direitos autorais reservados.*

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

O48s Oliveira, Isabelle Valente de
Solventes eutéticos naturais como materiais alternativos aplicados à extração de bioativos de matrizes amazônicas / Isabelle Valente de Oliveira. - 2026.
162 f. : il., color. ; 31 cm.

Orientador(a): Edgar Aparecido Sanches.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduacão em Ciência e Engenharia de Materiais, Manaus, 2026.

1. Solventes eutéticos naturais. 2. Extração verde. 3. Bixa orellana. 4. Genipa americana. 5. Otimização. I. Sanches, Edgar Aparecido. II. Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduacão em Ciência e Engenharia de Materiais. III. Título

---

ISABELLE VALENTE DE OLIVEIRA

SOLVENTES EUTÉTICOS NATURAIS COMO MATERIAIS ALTERNATIVOS APLICADOS À EXTRAÇÃO DE BIOATIVOS DE MATRIZES AMAZÔNICAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPGCEM) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) como quesito necessário para a obtenção do título de Mestre avaliada pela Banca Examinadora composta pelos membros:

BANCA EXAMINADORA

gov.br Documento assinado digitalmente
EDGAR APARECIDO SANCHES
Data: 03/06/2026 08:05:17-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Edgar Sanches Aparecido (Orientador e Presidente)
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)
Programa de Pós-Grac [illegible] lateriais (PPGCEM/UFAM)

gov.br Documento assinado digitalmente
PEDRO HENRIQUE CAMPELO FELIX
Data: 03/06/2026 08:57:41-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Pedro Henrique Campelo
Universidade Federal de Viçosa (UFV)

gov.br Documento assinado digitalmente
JAQUELINE DE ARAUJO BEZERRA
Data: 03/06/2026 09:08:27-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Jaqueline de Araújo Bezerra
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

Aprovada em 28 de maio de 2026.
Local da defesa: Plataforma virtual de comunicação (Google Meet) - Manaus.

"O mais difícil não é fazer o que você quer,
é saber o que você realmente quer"

Naval Ravikant

Agradecimentos

A realização desta dissertação foi possível graças ao apoio de pessoas e instituições que contribuíram de formas muito distintas ao longo deste percurso — e que, cada uma a seu modo, fazem parte deste resultado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pela concessão da bolsa de estudo, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro, que tornaram viável a dedicação integral a esta pesquisa.

À Universidade Federal do Amazonas, por meio da Faculdade de Tecnologia (FT) e do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPGCEM), pela estrutura acadêmica, pelas oportunidades de formação e pelo suporte ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edgar Aparecido Sanches, pela orientação que foi muito além do técnico. Sua calma diante das minhas dúvidas e preocupações me ensinou, na prática, que equilíbrio também faz parte da ciência. Em cada conversa, independentemente do tamanho do obstáculo, havia um ”vai dar certo”— e, com o tempo, aprendi a acreditar nisso tanto quanto ele acreditava. Obrigada por enxergar meu potencial antes de eu mesma conseguir enxergar, por me incentivar a seguir em frente e, especialmente, por me encorajar a não parar por aqui.

À equipe do Laboratório de Polímeros Nanoestruturados (NANOPOL), pela convivência diária que tornou este processo mais leve e produtivo. Saio do mestrado com muito mais conhecimento e experiências do que jamais imaginei ser possível, e parte significativa disso vem do que aprendi e vivi dentro deste laboratório — e das pessoas únicas que encontrei nele. Em especial ao Dr. Adriano de Souza Carolino, cujo rigor e generosidade no ensino da estatística e da análise de dados deixaram marca permanente na minha formação; ao Célio Matias Airone Macalia, pelo apoio constante na rotina de bancada e pela disponibilidade sempre que precisei; e à Josiana Moreira Mar, pelas contribuições nas discussões científicas, pelos direcionamentos precisos e pelo auxílio com os insumos — suporte sem o qual parte desta pesquisa simplesmente não teria acontecido.

Ao Sr. Ronny Araújo Martins, responsável pelo Laboratório de Controle de Qualidade da UFAM, pelo suporte estrutural e pela disponibilização de equipamentos essenciais na etapa final dos experimentos.

Aos colegas que o mestrado me deu e que, com o tempo, se tornaram amigos de verdade: Maria Gabriele, Laiany Teixeira e Raylene Larissa, pela companhia, pelas trocas e por tornarem os dias mais humanos dentro e fora da universidade. E ao Denilson Magalhães Nogueira, meu parceiro de bancada — a quem devo parte relevante do desenvolvimento experimental deste trabalho e com quem dividi, sem reservas, cada etapa desta trajetória. A parceria que construímos foi um dos presentes mais inesperados deste período.

Ao meu melhor amigo, Raimundo Ventura de Oliveira Neto, que esteve do meu lado nos momentos mais difíceis com uma presença que poucas pessoas sabem ter. Escutou quando eu precisava falar, aconselhou quando eu precisava de direção e, nas horas em que a dúvida pesava mais, me lembrou que eu tinha potencial para ir até o fim. Esse tipo de amizade não se explica — só se reconhece com gratidão.

À minha família, que é a base de tudo. Desde o momento em que souberam do meu ingresso no mestrado, nunca deixaram de torcer — e essa torcida atravessou cada etapa, cada dificuldade e cada conquista, até a concretização deste título. Ao meu pai, Anfremon Monteiro de Oliveira, e à minha mãe, Débora Rodrigues Valente, pelo amor que nunca precisou de condição e pelo incentivo que nunca faltou, mesmo quando eu estava longe e o caminho parecia longo demais. Ao meu irmão, Rafael Valente de Oliveira, à minha irmã, Manoela Valente Cunha Poggio, e ao meu cunhado, Renato Ferreira Poggio, pela presença e pelo afeto que só a família sabe oferecer. À minha avó, Yeda Monteiro de Oliveira, por ser uma das minhas maiores referências de força e por torcer por mim com uma fé inabalável de que tudo ia dar certo.

A todos que, de alguma forma, cruzaram este caminho e deixaram algo — meu sincero obrigada.

Resumo

A extração de compostos bioativos a partir de matrizes vegetais amazônicas enfrenta limitações inerentes ao uso de solventes orgânicos convencionais, cujos passivos ambientais, toxicidade e restrições regulatórias progressivas tornam necessária a busca por alternativas mais seguras e sustentáveis. Os solventes eutéticos naturais (NADES), formados pela combinação de componentes de origem biológica em razões molares específicas, constituem uma alternativa fundamentada nos princípios da química verde, com propriedades físico-químicas ajustáveis para diferentes classes de compostos-alvo. Esta dissertação desenvolveu, otimizou e aplicou sistemas NADES para a extração de compostos bioativos de *Bixa orellana L.* (urucum) e *Genipa americana L.* (jenipapo), duas espécies de relevância biológica e socioeconômica para a Amazônia, avaliando o desempenho extrativo, a caracterização química e o potencial tecnológico dos extratos obtidos. A abordagem metodológica foi conduzida em etapas sequencialmente dependentes: na fase de seleção, oito sistemas extrativos — seis NADES e dois controles hidroalcoólicos — foram comparados quanto ao teor de carotenoides, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH e FRAP), sendo timol:ácido lático (Thy:Lac, 1:2) e cloreto de colina:ácido lático (ChCl:Lac, 1:2) selecionados como mais promissores para *B. orellana* e *G. americana*, respectivamente, com superioridade estatisticamente comprovada sobre os solventes convencionais; ambos os sistemas foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com módulo de reflexão total atenuada (FTIR-ATR), cujos deslocamentos de bandas indicaram a formação de redes de ligações de hidrogênio coerentes com o caráter hidrofóbico do Thy:Lac e com o perfil polar e iônico do ChCl:Lac. Na fase de otimização, as condições de extração foram determinadas por delineamento Box-Behnken associado à metodologia de superfície de resposta (RSM), considerando proporção molar, temperatura e tempo de extração como variáveis independentes: para o Thy:Lac, proporção molar e temperatura atuaram como co-determinantes do rendimento de carotenoides, com ponto ótimo validado experimentalmente e ganho de aproximadamente 28% sobre a triagem preliminar; para o ChCl:Lac, apenas a proporção molar foi estatisticamente significativa, com ganho superior a 100% em relação à triagem e atividade antioxidante por DPPH tornando-se mensurável somente após a otimização. A avaliação dos extratos otimizados revelou perfis funcionais distintos entre as matrizes — maior reatividade por ABTS no extrato de urucum, consistente com o caráter lipofílico dos carotenoides, e desempenho superior por DPPH e FRAP no extrato de jenipapo, reflexo da diversidade de mecanismos antioxidantes dos compostos fenólicos hidrofílicos —, sendo a estabilidade cromática e de pH dos sistemas acompanhada ao longo de 150 dias. Na fase de aplicação, os extratos otimizados foram encapsulados por liofilização com maltodextrina e goma arábica em duas proporções extrato:carreador (1:3 e 1:5), resultando em retenção de aproximadamente 79% para os fenóis de *G. americana*, reflexo da compatibilidade entre compostos hidrofílicos e a matriz polar dos carreadores, e entre 43% e 46% para os carotenoides de *B. orellana*, determinada pela incompatibilidade intrínseca entre compostos apolares e um sistema encapsulante sem fase lipídica; a digestibilidade in vitro, conduzida pelo protocolo INFOGEST com amostragem nas fases oral, gástrica

e intestinal, demonstrou proteção efetiva na fase gástrica e recuperação parcial na fase intestinal para a formulação de *G. americana*, enquanto os encapsulados de *B. orellana* apresentaram perdas expressivas ao longo de todas as fases, com atividade antioxidante expressa apenas na fase intestinal e captada exclusivamente pelo ABTS. Os resultados estabelecem que a superioridade dos NADES sobre os solventes orgânicos convencionais é demonstrável quando há correspondência deliberada entre composição do solvente e natureza dos compostos-alvo, e confirmam a viabilidade de uma cadeia processual verde para bioativos amazônicos — da extração à avaliação do comportamento funcional pós-digestão — sem etapas de remoção de solvente do extrato, constituindo o primeiro estudo a avaliar sistematicamente NADES para essas duas matrizes da biodiversidade regional.

Palavras-chave: Solventes eutéticos naturais. Extração verde. Bixa orellana. Genipa americana. Otimização.

Abstract

The extraction of bioactive compounds from Amazonian plant matrices is constrained by the environmental liabilities, toxicity, and increasingly stringent regulatory requirements associated with conventional organic solvents, making the development of safer and more sustainable alternatives necessary. Natural deep eutectic solvents (NADES), formed by combining biologically derived components at specific molar ratios, represent a green chemistry-based alternative with tunable physicochemical properties suited to different target compound classes. This dissertation developed, optimized, and applied NADES systems for the extraction of bioactive compounds from *Bixa orellana L.* (annatto) and *Genipa americana L.* (genipap), two species of biological and socioeconomic relevance to the Amazon region, evaluating extractive performance, chemical characterization, and the technological potential of the obtained extracts. The methodological approach was structured in sequentially dependent stages: in the selection phase, eight extractive systems — six NADES and two hydroalcoholic controls — were compared for total carotenoid content, total phenolic compounds, and antioxidant activity (DPPH and FRAP), with thymol:lactic acid (Thy:Lac, 1:2) and choline chloride:lactic acid (ChCl:Lac, 1:2) identified as the most promising systems for *B. orellana* and *G. americana*, respectively, with statistically confirmed superiority over conventional solvents; both systems were characterized by attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR-ATR), with band shifts confirming the formation of hydrogen bond networks consistent with the hydrophobic character of Thy:Lac and the polar, ionic profile of ChCl:Lac. In the optimization phase, extraction conditions were determined using a Box-Behnken design combined with response surface methodology (RSM), with molar ratio, temperature, and extraction time as independent variables: for Thy:Lac, molar ratio and temperature were co-determinant factors for carotenoid yield, with an experimentally validated optimal point and a gain of approximately 28% over preliminary screening; for ChCl:Lac, only molar ratio was statistically significant, with a gain exceeding 100% over screening and DPPH antioxidant activity becoming measurable only after optimization. Evaluation of the optimized extracts revealed distinct functional profiles between the two matrices — higher ABTS reactivity in the annatto extract, consistent with the lipophilic nature of carotenoids, and superior DPPH and FRAP performance in the genipap extract, reflecting the diversity of antioxidant mechanisms in hydrophilic phenolic compounds —, with chromatic and pH stability of the systems monitored over 150 days. In the application phase, the optimized extracts were encapsulated by freeze-drying with maltodextrin and arabic gum at two extract-to-carrier ratios (1:3 and 1:5), yielding approximately 79% retention for *G. americana* phenolics, reflecting compatibility between hydrophilic compounds and the polar carrier matrix, and between 43% and 46% for *B. orellana* carotenoids, determined by the intrinsic incompatibility between nonpolar compounds and a carrier system lacking a lipid phase; in vitro digestibility, assessed using the INFOGEST protocol with sampling

across oral, gastric, and intestinal phases, demonstrated effective gastric protection and partial intestinal recovery for the *G. americana* formulation, while *B. orellana* encapsulates exhibited pronounced losses across all phases, with antioxidant activity expressed functionally only in the intestinal phase and captured exclusively by the ABTS method. The results establish that the superiority of NADES over conventional organic solvents is demonstrable when there is a deliberate match between solvent composition and target compound structure, and confirm the feasibility of a complete green processing chain for Amazonian bioactives — from extraction through evaluation of post-digestion functional behavior — without solvent removal steps, constituting the first study to systematically evaluate NADES for both Amazonian matrices investigated.

Keywords: Natural deep eutectic solvents. Green extraction. Bixa orellana. Genipa americana. Optimization.

Lista de Figuras

2.1 Esquema simplificado da formação de sistemas eutéticos naturais (NADES) a partir de interações entre aceitadores (HBA) e doadores (HBD) de ligações de hidrogênio. 16

2.2 Frutos e sementes de urucum (*Bixa orellana*). 27

2.3 Frutos de jenipapo (*Genipa americana*). 28

3.1 Sistemas extrativos - Thy:Lac, ChCl:Lac, ChCl:Gly, Gly:Lac, ChCl:Sor, Sor:Lac, EtOH, MeOH. 44

3.2 Extratos de urucum. 45

3.3 Desempenho de diferentes sistemas extrativos aplicados à *Bixa orellana* em ensaio de TCC. 46

3.4 Extratos de jenipapo. 49

3.5 Desempenho de diferentes sistemas extrativos aplicados à *Genipa americana* em ensaio de TPC. 49

3.6 Desempenho de diferentes sistemas extrativos aplicados à *Bixa orellana* em ensaio de DPPH. 52

3.7 Desempenho de diferentes sistemas extrativos aplicados à *Bixa orellana* e *Genipa americana* em ensaio de FRAP. 54

3.8 Perfis espectrais de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) de timol, ácido lático e do sistema Thy:Lac (1:2). 58

3.9 Perfis espectrais de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) de cloreto de colina, ácido lático e do sistema ChCl:Lac (1:2). 59

4.1 Gráfico Q-Q plot dos resíduos do modelo quadrático ajustado para o teor de carotenoides totais (TCC) de *Bixa orellana* extraídos com o NADES Thy:Lac. 73

4.2 Gráfico Q-Q plot dos resíduos do modelo quadrático ajustado para o teor de compostos fenólicos totais (TPC) de *Genipa americana* extraídos com o NADES ChCl:Lac. 74

4.3 Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados ($|t|$) para o teor de carotenoides totais (TCC) de *Bixa orellana* extraídos com o NADES Thy:Lac. 75

4.4 Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados ($|t|$) para o teor de compostos fenólicos totais (TPC) de *Genipa americana* extraídos com o NADES ChCl:Lac. A linha tracejada indica o valor crítico de t ($\alpha = 0{,}05$; df = 7; $t_{\text{crit}} = 2{,}36$). 77

4.5 Superfícies de resposta (D, E, F) e curvas de contorno (A, B, C) para o teor de carotenoides totais (TCC) de *Bixa orellana* extraídos com o NADES Thy:Lac. 79

4.6 Superfícies de resposta (D, E, F) e curvas de contorno (A, B, C) para o teor de compostos fenólicos totais (TPC) de *Genipa americana* extraídos com o NADES ChCl:Lac. 80

4.7 Perfis espectrais de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) de *Bixa orellana*, do sistema Thy:Lac (2:1) e do extrato otimizado. 85

4.8 Perfis espectrais de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) de *Genipa americana*, do sistema ChCl:Lac (1:2) e do extrato otimizado. . . . 87

4.9 Variação do pH ao longo do tempo. 89

4.10 Variação total de cor (E) ao longo do tempo de armazenamento para o extrato otimizado de *Bixa orellana*. 94

4.11 Variação total de cor (E) ao longo do tempo de armazenamento para o extrato otimizado de *Genipa americana*. 97

5.1 Encapsulados de extratos de *Bixa orellana* (BOE) e *Genipa americana* (GAE) nas formulações 1:3 e 1:5 (relação núcleo:material de parede). . . . 109

5.2 Retenção de fenóis totais (TPC) e carotenoides (TCC) após encapsulação de extratos de *Bixa orellana* e *Genipa americana* em formulações 1:3 e 1:5. Os resultados representam os valores médios de retenção dos compostos bioativos obtidos para as diferentes formulações avaliadas. 110

5.3 Rendimento de secagem das formulações encapsuladas de extratos de *Bixa orellana* e *Genipa americana* nas proporções 1:3 e 1:5. Os resultados representam os valores de rendimento de secagem obtidos para as diferentes formulações e matrizes vegetais avaliadas. 111

5.4 Conteúdo de carotenoides totais (TCC) em extratos encapsulados de *Bixa orellana* nas formulações 1:3 e 1:5 ao longo das fases simuladas da digestão in vitro (oral, gástrica e intestinal). 115

5.5 Perfil de conteúdo de carotenoides totais (TCC) em função do tempo ao longo das fases simuladas da digestão in vitro em extratos encapsulados de *Bixa orellana* nas formulações 1:3 e 1:5. 116

5.6 Conteúdo de fenóis totais (TPC) em extratos encapsulados de *Genipa americana* nas formulações 1:3 e 1:5 ao longo das fases simuladas da digestão in vitro (oral, gástrica e intestinal). 119

5.7 Perfil de conteúdo de fenóis totais (TPC) em função do tempo ao longo das fases simuladas da digestão in vitro em extratos encapsulados de *Genipa americana* nas formulações 1:3 e 1:5. 121

5.8 Atividade antioxidante ABTS de extratos encapsulados de *Bixa orellana* e *Genipa americana* nas formulações 1:3 e 1:5 após as fases simuladas da digestão in vitro (oral, gástrica e intestinal) 125

5.9 Perfil temporal da atividade antioxidante ABTS de extratos encapsulados de *Bixa orellana* e *Genipa americana* nas formulações 1:3 e 1:5 ao longo das fases simuladas da digestão in vitro (oral, gástrica e intestinal). 127

Lista de Tabelas

3.1 Descrição dos reagentes químicos. 35

3.2 Teor de carotenoides totais nos extratos de urucum. 47

3.3 Teor de fenólicos totais nos extratos de jenipapo. 50

3.4 Efeito do potencial antioxidante dos extratos de urucum e jenipapo pelo método DPPH. 53

3.5 Efeito do potencial antioxidante dos extratos de urucum e jenipapo por redução férrica. 55

3.6 Posições das bandas de absorção no infravermelho (cm^{-1}) e deslocamentos espectrais dos componentes puros e do sistema Thy:Lac (1:2). 59

3.7 Posições das bandas de absorção no infravermelho (cm^{-1}) e deslocamentos espectrais dos componentes puros e do sistema ChCl:Lac (1:2). 60

4.1 Descrição dos reagentes químicos escolhidos para os NADES. 65

4.2 Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento Box-Behnken (BBD) para otimização da extração com os NADES ChCl:Lac e Thy:Lac. . 67

4.3 Matriz do planejamento Box-Behnken (BBD) para otimização da extração com o NADES ChCl:Lac e Thy:Lac, com os valores das variáveis independentes decodificados. 67

4.4 Atividade antioxidante dos extratos otimizados de *Bixa orellana* e *Genipa americana*. 83

4.5 Posições das bandas de absorção no infravermelho (cm^{-1}) e deslocamentos espectrais entre a matriz vegetal *Bixa orellana*, o extrato otimizado e o solvente eutético Thy:Lac (2:1). 86

4.6 Posições das bandas de absorção no infravermelho (cm^{-1}) e deslocamentos espectrais entre a matriz vegetal *Genipa americana*, o extrato otimizado e o solvente eutético ChCl:Lac (1:2). 88

4.7 Valores de pH ao longo do tempo de armazenamento para o sistema ChCl:Lac em diferentes proporções. 91

4.8 Valores de pH ao longo do tempo de armazenamento para o sistema Thy:Lac em diferentes proporções. 92

4.9 Variação de cor (ΔE) de *Bixa orellana* durante o armazenamento. 95

4.10 Variação de cor (ΔE) de *Genipaa americana* durante o armazenamento. . . 98

5.1 Conteúdo de carotenoides totais (TCC) nas fases da digestão in vitro . . . 116

5.2 Perfil temporal de liberação de TCC. 117

5.3 Conteúdo de fenóis totais (TPC) nas fases da digestão in vitro 120

5.4 Perfil temporal de liberação de TPC. 122

5.5 Atividade antioxidante ABTS nas fases da digestão in vitro 126

5.6 Perfil temporal da atividade antioxidante ABTS. 129

Lista de Abreviaturas e Símbolos:

ABTS - 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

ANOVA - Análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATR - Reflectância Total Atenuada

BBD - Planejamento Box-Behnken

BOE - Extrato encapsulado de *Bixa orellana*

CAS - Chemical Abstracts Service

CHCL:GLY - Cloreto de colina:glicerol

CHCL:LAC - Cloreto de colina:ácido lático

CHCL:SOR - Cloreto de colina:sorbitol

DAD - Detector de Arranjo de Diodos

DE - Equivalente de dextrose

DES - Solventes eutéticos profundos

DFT - Teoria do Funcional da Densidade

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EFSA - European Food Safety Authority

EtOH - Etanol

FDA - Food and Drug Administration

FRAP - Poder antioxidante de redução férrica

FTIR - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

GA - Goma arábica

GAE - Extrato encapsulado de *Genipa americana*

GAE - Equivalente de ácido gálico

GLY:LAC - Glicerol:ácido lático

GRAS - Generally Recognized as Safe

HBA - Aceitador de ligação de hidrogênio

HBD - Doador de ligação de hidrogênio

HDES - Solventes eutéticos profundos hidrofóbicos

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IARC - International Agency for Research on Cancer

INFOGEST - Protocolo de digestão gastrointestinal simulada

LSD - Diferença mínima significativa

MAE - Extração assistida por micro-ondas

MeOH - Metanol

MSR/RSM - Metodologia de Superfície de Resposta

NADES - Solventes eutéticos naturais (Natural Deep Eutectic Solvents)

ND - Não detectado

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

SD - Desvio padrão

SGF - Fluido gástrico simulado (Simulated Gastric Fluid)

SIF - Fluido intestinal simulado (Simulated Intestinal Fluid)

SOR:LAC - Sorbitol:ácido lático

SSF - Fluido salivar simulado (Simulated Salivary Fluid)

TAC - Capacidade Antioxidante Total

TCC - Teor de Carotenoides Totais

THY:LAC - Timol:ácido lático

TPC - Teor de Compostos Fenólicos Totais

TPTZ - 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina

UAE - Extração assistida por ultrassom

Sumário

1 Introdução Geral **1**

1.1 Contextualização e Problemática 1

1.2 Solventes Eutéticos Naturais como Alternativa Tecnológica 3

1.2.1 Origem do conceito e definição 3

1.2.2 Por que são considerados "solventes verdes"? 4

1.2.3 Propriedades que os tornam promissores para extração de bioativos 5

1.2.4 Lacunas científicas existentes 7

1.3 Potencial das Matrizes Amazônicas Estudadas 8

1.3.1 *Bixa orellana L.* (urucum): perfil fitoquímico, relevância regional e lacuna extrativa 8

1.3.2 *Genipa americana L.* (jenipapo): iridoides, pigmento azul e potencial biotecnológico 10

1.4 Objetivos 13

1.4.1 Geral 13

1.4.2 Específicos 13

2 Fundamentação Teórica **14**

2.1 Solventes Eutéticos Naturais (NADES) 14

2.1.1 Formação de Sistemas Eutéticos e Interações Intermoleculares . . . 15

2.1.2 Classificação e Composição dos NADES 17

2.1.3 Métodos de Preparo e Caracterização dos NADES 18

2.1.4 Propriedades Físico-químicas Relevantes 19

2.1.5 Vantagens e Limitações Tecnológicas 20

2.2 Aplicação de NADES na Extração de Compostos Bioativos 21

2.2.1 Interações Soluto-solvente na Extração de Bioativos 21
2.2.2 Fatores que Influenciam o Desempenho da Extração 22
2.2.3 Otimização de Processos Extrativos 23
2.3 Compostos Bioativos de Interesse 23
2.3.1 Compostos Fenólicos 24
2.3.2 Carotenoides 25
2.4 Espécies Amazônicas Estudadas 25
2.4.1 *Bixa orellana* 26
2.4.2 *Genipa americana* 28
2.5 Encapsulação e Digestibilidade de Compostos Bioativos 29
2.5.1 Encapsulação de Compostos Bioativos 29
2.5.2 Materiais de Parede em Sistemas Encapsulados 30
2.5.3 Liberação dos Compostos Bioativos 31
2.5.4 Digestibilidade In Vitro 32

3 Seleção e caracterização de solventes eutéticos naturais para a extração de compostos bioativos de *Bixa orellana* e *Genipa americana* 33

3.1 Introdução 33
3.2 Materiais 35
3.2.1 Reagentes Químicos 35
3.2.2 Espécies Vegetais 36
3.3 Métodos 36
3.3.1 Preparação das Amostras 36
3.3.2 Preparação dos Solventes Eutéticos Naturais (NADES) 37
3.3.3 Extração dos Compostos Bioativos 37
3.3.3.1 Avaliação Preliminar 37
3.3.4 Determinação de Compostos Bioativos e Ensaios Antioxidantes . . 38
3.3.4.1 Teor de Fenólicos Totais (TPC) 38
3.3.4.2 Teor de Carotenoides Totais (TCC) 39
3.3.4.3 Ensaio 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) 40
3.3.4.4 Ensaio Capacidade Antioxidante por Redução Férrica (FRAP) 40

3.3.5 Caracterização dos Solventes 41
3.3.5.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) 41
3.3.6 Análise Estatística 42
3.4 Resultados e Discussão 42
3.4.1 Avaliação Preliminar 42
3.4.1.1 Extração de Carotenoides Totais 44
3.4.1.2 Extração de Compostos Fenólicos 48
3.4.1.3 Ensaio de Atividade Antioxidante DPPH 51
3.4.1.4 Ensaio de Atividade Antioxidante FRAP 54
3.4.1.5 Análise Integrada dos Parâmetros de Extração e Atividade Antioxidante 56
3.4.2 Seleção dos NADES Mais Promissores 57
3.4.3 Análise Espectroscópica (FTIR) 57
3.5 Conclusões 61

4 Aplicação da metodologia de superfície de resposta na otimização da extração de compostos bioativos com solventes eutéticos naturais 63

4.1 Introdução 63
4.2 Materiais 65
4.2.1 Reagentes Químicos 65
4.2.2 Espécies Vegetais 65
4.3 Métodos 65
4.3.1 Preparação das Amostras 65
4.3.2 Preparação dos Solventes Eutéticos Naturais (NADES) 66
4.3.3 Planejamento Experimental Box-Behnken 66
4.3.4 Determinação de Compostos Bioativos e Ensaios Antioxidantes . . 68
4.3.4.1 Teor de Fenólicos Totais (TPC) 69
4.3.4.2 Teor de Carotenoides Totais (TCC) 69
4.3.4.3 Ensaio 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) 69
4.3.4.4 Ensaio Capacidade Antioxidante por Redução Férrica (FRAP) 69

4.3.4.5 Ensaio 2,2′-azino-bis(3-etilben zotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) . . . 69
4.3.5 Caracterização dos Extratos . . . 70
4.3.5.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) . . . 70
4.3.6 Estabilidade dos Sistemas Extrativos e Extratos . . . 70
4.3.6.1 pH . . . 70
4.3.6.2 Colorimetria . . . 71
4.4 Resultados e Discussão . . . 71
4.4.1 Otimização da Extração por Metodologia de Superfície de Resposta 72
4.4.1.1 Ajuste e Validação dos Modelos . . . 72
4.4.1.2 Efeito das Variáveis sobre a Extração . . . 75
4.4.1.3 Superfícies de Resposta e Interações entre Variáveis . . . 78
4.4.1.4 Condições Ótimas de Extração e Validação Experimental . 81
4.4.1.5 Atividade Antioxidante dos Extratos Otimizados . . . 82
4.4.2 Caracterização dos Extratos Otimizados por FTIR . . . 85
4.4.3 Estabilidade dos NADES e Extratos . . . 89
4.4.3.1 Análise de pH . . . 89
4.4.3.2 Análise Colorimétrica . . . 93
4.5 Conclusões . . . 98

5 Encapsulação de extratos obtidos com solventes eutéticos naturais: desempenho de encapsulação e digestibilidade in vitro 101

5.1 Introdução . . . 101
5.2 Materiais . . . 103
5.2.1 Reagentes Químicos . . . 103
5.2.2 Espécies Vegetais . . . 103
5.3 Métodos . . . 103
5.3.1 Preparação das Amostras . . . 103
5.3.2 Obtenção dos Extratos Bioativos . . . 103
5.3.3 Encapsulação dos Extratos . . . 104
5.3.4 Retenção de Compostos Bioativos . . . 105

5.3.5 Rendimento de Secagem 105
5.3.6 Digestibilidade In Vitro 106
5.3.7 Determinação de Compostos Bioativos e Ensaios Antioxidantes . . 107
5.3.7.1 Teor de Fenólicos Totais (TPC) 107
5.3.7.2 Teor de Carotenoides Totais (TCC) 107
5.3.7.3 Ensaio 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) 107
5.3.7.4 Ensaio 2,2′-azino-bis(3-etilben zotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) 107
5.3.7.5 Análise Estatística 108
5.4 Resultados e Discussão 108
5.4.1 Desempenho da Encapsulação 108
5.4.2 Digestibilidade in vitro 113
5.4.3 Atividade Antioxidante como Indicador Funcional 124
5.4.4 Visão Integrada das Análises 130
5.5 Conclusões 133

6 Conclusões Gerais e Perspectivas Futuras **135**

REFERÊNCIAS **141**

Capítulo 1

Introdução Geral

1.1 Contextualização e Problemática

A extração de compostos bioativos a partir de matrizes vegetais é uma etapa central em cadeias produtivas voltadas a alimentos funcionais, fármacos e cosméticos. Esse processo depende historicamente de solventes orgânicos convencionais — em especial hexano, metanol, clorofórmio, acetato de etila e diclorometano — cuja eficiência extrativa é amplamente reconhecida, mas cujos passivos ambientais e sanitários tornaram-se progressivamente insustentáveis diante das exigências contemporâneas da química verde [1, 2].

Os solventes orgânicos de base petroquímica são, por definição, produtos não renováveis. Seu uso em larga escala gera resíduos perigosos, exige sistemas onerosos de recuperação e descarte, e representa risco direto para operadores e para o entorno ambiental das plantas industriais. Maki e colaboradores em 2025 [3] sintetizam essa problemática ao demonstrar que esses compostos são predominantemente inflamáveis, voláteis e frequentemente tóxicos, sendo responsáveis por impactos ambientais relevantes, incluindo a contribuição para o efeito estufa por meio da emissão de compostos orgânicos voláteis (COVs). Os autores enfatizam que as preocupações crescentes com segurança, ambiente e economia têm pressionado a indústria a migrar para solventes mais sustentáveis.

No setor específico de bioativos, o problema se torna ainda mais agudo porque os solventes interagem diretamente com compostos destinados ao consumo humano ou à aplicação dermatológica. A presença de resíduos de solvente no extrato final não é apenas uma questão de desempenho técnico — é uma barreira regulatória concreta. De acordo com Julshahril e colaboradores (2025) [4], os solventes orgânicos convencionais usados em processos extrativos incluem etanol, metanol, clorofórmio, éter de petróleo e acetato de etila, todos considerados insustentáveis, muito voláteis e tóxicos para o meio ambiente e a saúde humana. Para atender aos princípios da química verde, a recuperação de mate-

riais bioativos deve ser realizada por meio de procedimentos ambientalmente amigáveis, sustentáveis e econômicos. Nesse contexto, as regulamentações europeias sobre aditivos alimentares e os marcos nacionais da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) impõem limites rigorosos para resíduos de solventes em produtos com destinação alimentar e farmacêutica, o que restringe progressivamente o uso de compostos como clorofórmio e hexano em processos cuja saída é consumível.

A extração de carotenoides lipofílicos — classe que inclui a bixina, principal pigmento das sementes de Bixa orellana — depende tradicionalmente de solventes apolares como o clorofórmio, que está classificado pela International Agency for Research on Cancer (IARC) como potencialmente carcinogênico para humanos. Ashraf e colaboradores em 2023 [5] documentaram que a extração de bixina com clorofórmio, embora eficiente em termos de rendimento, compromete o perfil antioxidante do extrato, uma vez que o clorofórmio tem baixa capacidade de capturar radicais livres. Em contrapartida, extratos obtidos com solventes mais polares, como a água, demonstram maior atividade antimicrobiana e antioxidante em ensaios in vitro, evidenciando que a escolha do solvente não apenas define o composto extraído, mas condiciona diretamente a bioatividade do extrato final.

Do ponto de vista energético, o processo extrativo convencional agrava ainda mais o passivo ambiental. Estima-se que as etapas de extração e separação consomem mais de 50% da energia de todo o processo industrial, resultando em rendimentos frequentemente modestos apesar do alto custo energético e do extenso uso de solventes. Essa ineficiência é particularmente problemática no contexto de matrizes vegetais tropicais, cujos compostos bioativos de interesse — como iridoides e apocarotenoides — são termossensíveis e requerem condições de processo controladas para que sua integridade molecular seja preservada [6].

A consequência de não inovar nesse campo é multidimensional. Ela implica dependência continuada de insumos petroquímicos em setores que cada vez mais exigem certificações de sustentabilidade, impossibilita o atendimento a mercados que valorizam a rastreabilidade e a responsabilidade ambiental, e compromete o potencial biotecnológico de matrizes vegetais ainda pouco exploradas, como as da Amazônia. Para espécies nativas como *Bixa orellana* e *Genipa americana*, que integram cadeias produtivas da sociobiodi-

versidade regional e possuem mercado crescente em alimentos, cosméticos e fármacos naturais, a ausência de alternativas extratoras seguras e eficientes representa também uma barreira à inserção competitiva em mercados internacionais que operam sob lógica de produção limpa. É nesse cenário que os solventes eutéticos naturais emergem como alternativa tecnológica de base científica sólida.

1.2 Solventes Eutéticos Naturais como Alternativa Tecnológica

1.2.1 Origem do conceito e definição

Os solventes eutéticos naturais (do inglês Natural Deep Eutectic Solvents, NADES) são sistemas líquidos formados pela mistura de compostos naturais em razões molares específicas, cujo ponto de fusão é significativamente inferior ao de cada componente isolado. Esse comportamento resulta de interações intermoleculares intensas — predominantemente ligações de hidrogênio — que conferem ao sistema uma estrutura supramolecular estável em temperatura ambiente.

O conceito foi sistematizado por Dai e colaboradores em 2013 [7], que demonstraram, por meio de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), a existência inequívoca de ligações de hidrogênio entre os componentes de mais de 100 sistemas eutéticos produzidos a partir de metabólitos primários de plantas — açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e poliois. Os autores mediram propriedades físicas como atividade de água, densidade, viscosidade, polaridade e comportamento térmico, e demonstraram que a solubilidade de biomoléculas nesses sistemas era, em sua maioria, expressivamente superior à observada em água pura. A hipótese original, proposta por Choi e colaboradores em 2011 [8], foi de que essas misturas existem naturalmente no interior de células vegetais como uma terceira fase líquida — ao lado da água e dos lipídios —, desempenhando funções fisiológicas como dissolução de metabólitos, criopreservação e resistência a estresses osmóticos.

A composição dos NADES baseia-se em dois componentes principais: um receptor de ligação de hidrogênio (HBA, do inglês hydrogen bond acceptor) e um doador de ligação de hidrogênio (HBD, hydrogen bond donor). A água pode ser incorporada como terceiro

componente, e é fortemente retida na estrutura do sistema eutético. A distinção entre DES (Deep Eutectic Solvents) sintéticos e NADES reside apenas na origem dos componentes: os NADES são subconjunto dos DES cujos constituintes são exclusivamente compostos naturalmente ocorrentes, o que fundamenta o seu apelo como solventes verdes para aplicações alimentares e farmacêuticas [9].

1.2.2 Por que são considerados "solventes verdes"?

A qualificação dos NADES como solventes verdes não é uma generalização de marketing científico — é uma classificação sustentada por critérios objetivos que os diferenciam tanto dos solventes orgânicos convencionais quanto dos líquidos iônicos sintéticos, outra categoria de solventes alternativos que, apesar de promissora em termos de eficiência, carrega relevância de toxicidade, custo de síntese e baixa biodegradabilidade.

O primeiro critério é a origem renovável das matérias-primas. Os NADES são compostos de substâncias naturais como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, poliois e derivados de colina, todas renováveis, não tóxicas, biodegradáveis e ambientalmente sustentáveis. Diferentemente dos solventes orgânicos, que necessitam de grandes volumes de matérias-primas petroquímicas e geram resíduos químicos perigosos no processo de síntese, os NADES são obtidos por simples mistura a temperatura moderada, sem reações químicas adicionais, sem geração de subprodutos e sem emprego de catalisadores tóxicos [10].

O segundo critério é a segurança para consumo humano. Destaca-se que combinações racionais de HBA e HBD, frequentemente compostas por substâncias classificadas como GRAS (Generally Recognized as Safe) pela FDA, permitem a extração seletiva e de alto rendimento a partir de plantas, subprodutos agroindustriais e resíduos alimentares, sem a necessidade de etapas de remoção de solvente do extrato final — uma vantagem direta sobre os solventes orgânicos convencionais, que exigem evaporação ou extração líquido-líquido para eliminação de resíduos [11].

O terceiro critério é a baixa volatilidade. Ao contrário dos solventes orgânicos clássicos, que evaporam facilmente e contribuem para a contaminação atmosférica e formação de COVs, os NADES apresentam pressão de vapor desprezível. Reforça-se que, em razão de sua menor toxicidade e biodegradabilidade aprimorada em relação aos solventes de

base fóssil, os NADES são reconhecidos como solventes verdes, com aplicações crescentes na indústria alimentícia para extração, conservação e análise de compostos de interesse nutricional [12].

A biodegradabilidade, contudo, merece tratamento cuidadoso. A literatura mais recente aponta que essa propriedade não pode ser generalizada automaticamente para qualquer sistema NADES sem dados experimentais específicos. Descreve-se que estudos de biodegradabilidade conduzidos com sistemas baseados em cloreto de colina demonstraram classificação como biodegradáveis por microrganismos de águas residuais, sem inibição da germinação do trigo e com citotoxicidade de baixa a moderada em células humanas. No entanto, os mesmos autores alertam que, quando misturados, os componentes dos NADES podem apresentar toxicidade maior do que a de cada componente isolado, em razão de efeitos sinérgicos — um aspecto que reforça a necessidade de avaliação caso a caso para cada sistema específico [13].

Essa nuance é metodologicamente relevante e deve ser incorporada aos protocolos de pesquisa com NADES. A classificação como "verde"pressupõe a avaliação experimental do sistema formulado, não apenas a inferência a partir das propriedades dos componentes individuais. A literatura disponível em bases científicas registra que sistemas baseados em cloreto de colina, ácido láctico, glicerol, açúcares e aminoácidos apresentam, de modo geral, perfis favoráveis de biodegradabilidade e baixa toxicidade — mas a confirmação deve ser obtida para cada nova formulação desenvolvida [11, 13].

1.2.3 Propriedades que os tornam promissores para extração de bioativos

A principal vantagem funcional dos NADES no contexto extrativo reside em sua tunabilidade — a capacidade de ajustar sistematicamente as propriedades físico-químicas do solvente por meio da escolha dos componentes (HBA e HBD), da razão molar entre eles e do teor de água incorporado. Essa flexibilidade permite projetar solventes com polaridade, pH e viscosidade específicos para compostos-alvo definidos, algo estruturalmente inviável de alcançar com solventes de composição fixa como etanol ou hexano.

É demonstrado que a polaridade pode ser o parâmetro físico-químico com maior impacto direto na seletividade extrativa dos NADES. Sistemas hidrofílicos, como colina:glicerol, colina:ácido láctico e betaína:ácido cítrico, exibem constantes dielétricas ele-

vadas ($\epsilon \approx 55$–65), indicando desempenho superior para antioxidantes altamente polares, incluindo ácidos fenólicos e antocianinas. Em contraste, NADES hidrofóbicos — como mentol:ácido caprílico ou dodecanol:ácido láurico — apresentam constantes dielétricas abaixo de 15 e são mais eficientes para carotenoides, clorofilas e tocoferóis lipofílicos. Os autores ressaltam que, diferentemente de sistemas binários convencionais como etanol-água, cuja faixa de polaridade é estreita, a polaridade dos NADES pode ser precisamente ajustada pela variação do tipo e da proporção dos componentes [13].

Essa característica é relevante para a extração de compostos lipofílicos, como os carotenoides da classe dos apocarotenoides — que inclui bixina e norbixina. Estudos com NADES hidrofóbicos baseados em mentol demonstraram eficiência superior ao hexano convencional na extração de carotenoides de matrizes vegetais. Demonstra-se que extratos de cascas de laranja obtidos com NADES hidrofóbicos à base de mentol:eucaliptol apresentaram maior conteúdo de carotenoides totais e superior capacidade antioxidante em comparação a extratos obtidos com hexano, com estabilidade de cor mantida por até 20 dias de armazenamento — resultado atribuído às interações de ligação de hidrogênio e forças de Van der Waals presentes nos sistemas eutéticos, que criam um microambiente estabilizador capaz de proteger estruturas insaturadas contra oxidação e isomerização [14].

Badea e colaboradores em 2025 [15] demonstraram que a extração assistida por ultrassom combinada com NADES de cloreto de colina:1,3-butanediol permitiu a recuperação simultânea de carotenoides e tocoferol de resíduos de tomate, com rendimentos superiores aos obtidos com solventes orgânicos convencionais. Os autores confirmaram que sistemas hidrofóbicos baseados em mentol:ácido oleico foram mais eficientes para compostos da fração lipofílica, enquanto sistemas hidrofílicos apresentaram melhor desempenho para compostos polares — reforçando a importância da compatibilidade de polaridade entre NADES e composto-alvo para otimização do rendimento extrativo.

No caso dos compostos terpênicos e glicosídicos — classe na qual se inserem os iridoides de *Genipa americana* —, NADES baseados em ácidos orgânicos demonstram desempenho promissor em razão da alta afinidade com ligações de hidrogênio estabelecidas com grupos hidroxila e éster desses compostos. Foi estudado que NADES à base de ácido láctico combinado com sacarose ou sódio acetato apresentaram extração superior de compostos fenólicos e terpênicos em comparação com solventes convencionais, sendo a

flexibilidade das propriedades físico-químicas dos NADES — ajustáveis para extração de terpenos e terpenoides — evidenciada em múltiplos sistemas estudados. Ressalta-se que a extração de β-cariofileno com NADES hidrofóbicos foi notavelmente superior à obtida com hexano, etanol, metanol e água em estudos comparativos, evidenciando o papel da composição do HBD no controle da seletividade extrativa [16].

Outro aspecto de relevância crescente é a capacidade dos NADES de estabilizar compostos bioativos na fase pós-extração, funcionando simultaneamente como solvente e como excipiente protetor. Bragagnolo e colaboradores em 2024 [9] documentam que NADES baseados em ácidos orgânicos são frequentemente mais polares do que a própria água, o que amplia sua capacidade de estabelecer ligações de hidrogênio com compostos fenólicos e aumenta o poder de dissolução de bioativos hidrossolúveis. A tunabilidade de polaridade foi confirmada experimentalmente por análises de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e RMN em sistemas à base de cloreto de colina e ácido láctico, nos quais a viscosidade diminuiu em até 93% com a adição de água e em até 83,5% com o aumento de temperatura, sem ruptura das interações eutéticas responsáveis pela estrutura do sistema [17].

O junção de NADES com técnicas de extração assistida por energia — ultrassom, micro-ondas e fluidos pressurizados — tem emergido como estratégia para mitigar a principal limitação operacional desses sistemas: a alta viscosidade, que dificulta a transferência de massa. É documentado que o acoplamento de NADES com extração assistida por ultrassom e micro-ondas aumentou a eficiência extrativa ao mesmo tempo em que protegeu compostos termossensíveis, resultando também em menores emissões de CO_2 em comparação com a hidrodestilação convencional [11]. Essa combinação representa o estado da arte em extrações verdes de alta eficiência e abre perspectivas concretas para aplicação em matrizes vegetais complexas, como as espécies amazônicas.

1.2.4 Lacunas científicas existentes

Com relação ao crescimento acelerado da literatura sobre NADES nos últimos cinco anos, a transição desses sistemas do laboratório para a indústria enfrenta obstáculos concretos que merecem reconhecimento no contexto desta pesquisa. A viscosidade elevada é a limitação operacional mais frequentemente reportada. A extração de compostos bioativos

com NADES pode ser desafiadora em razão da alta viscosidade, que dificulta o manuseio e pode causar obstruções em sistemas de extração contínua e nas etapas de filtração; além disso, em comparação com solventes menos viscosos, os NADES requerem maior aporte energético para intensificar a transferência de massa pelo contato solvente-soluto [9].

Do ponto de vista regulatório e toxicológico, Martins e colaboradores identificam como barreiras persistentes, a ausência de frameworks regulatórios específicos de autoridades como FDA e EFSA, gerando incerteza quanto à classificação dos NADES como solvente, aditivo ou carreador; a falta de protocolos toxicológicos padronizados para misturas ternárias ou quaternárias; e a escassez de estudos sensoriais e de migração, especialmente para aplicações em produtos alimentares processados. Os autores observam ainda que apenas 18% dos estudos publicados entre 2020 e 2024 reportam dados experimentais sobre reutilização de NADES, e menos de 10% incluem avaliações sensoriais do produto final — uma lacuna relevante para a viabilidade industrial [11].

1.3 Potencial das Matrizes Amazônicas Estudadas

1.3.1 *Bixa orellana L.* (urucum): perfil fitoquímico, relevância regional e lacuna extrativa

Bixa orellana L. (família Bixaceae), popularmente conhecida como urucum, é um arbusto nativo das regiões tropicais da América Central e do Sul, com ocorrência expressiva na bacia amazônica. Suas sementes são a principal fonte comercial de bixina ($C_{25}H_{30}O_4$) e norbixina, apocarotenoides produzidos pela degradação oxidativa de carotenoides C40 — em particular o licopeno — por via enzimática específica da espécie. Bixina constitui cerca de 80% do total de carotenoides presentes no revestimento das sementes, sendo o componente majoritário do extrato; a norbixina, sua contraparte hidrossolúvel, é obtida por saponificação alcalina da bixina [5].

O perfil farmacológico da bixina ultrapassa sua função histórica como corante alimentar. De acordo com Ashraf e colaboradores em 2023, consolida-se evidências de que a bixina atua na regulação das vias Nrf2/MyD88/TLR4 e TGF-β1/PPAR-γ/Smad3, conferindo atividades antifibrótica, antioxidante e anti-inflamatória comprovadas. Os mesmos autores documentam atividade anticâncer in vitro contra linhagens de células de melanoma (B16), leucemia (HL60), osteossarcoma (U20S), próstata (PC3), cólon (HCT-116),

mama (MCF-7) e tireóide (DRO e BHP-16), além de atividade antiparasitária, hipoglicemiante e hepatoprotetora. Demonstra-se ainda a atividade antinociceptiva da bixina em modelos de dor aguda em roedores, relacionada à inibição da migração de neutrófilos — o que amplia as perspectivas de uso farmacológico da molécula [18].

Do ponto de vista da composição integral das sementes, demonstraram que quando as sementes são extraídas com clorofórmio, a bixina é detectada como composto majoritário; quando a extração é realizada com hidróxido de sódio ou água, a norbixina é obtida. Os autores observaram ainda que, no extrato clorofórmico, a atividade antioxidante é limitada em razão da fraca capacidade de captura de radicais livres por esse solvente, enquanto o extrato aquoso demonstrou maior atividade antimicrobiana [19]. Essa observação é fundamental para a compreensão do estado da arte no campo - o solvente não apenas determina o composto extraído, mas condiciona o perfil funcional do extrato. Em estudo posterior, confirmaram a predominância do isômero 9-cis de bixina em extratos obtidos por Soxhlet com hexano e clorofórmio, com validação analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) segundo diretrizes ICH Q2(R2), e documentaram atividade antifúngica moderada da bixina purificada frente a oito cepas de Candida [20].

Do ponto de vista econômico, o urucum é o segundo corante natural mais relevante no mercado global, superado apenas pelo caramelo. O Brasil é um dos principais produtores e exportadores mundiais da espécie, e a cadeia produtiva do urucum integra a sociobiodiversidade amazônica com expressão em comunidades tradicionais e agricultores familiares da região Norte. A demanda crescente por corantes naturais em substituição aos sintéticos — impulsionada por legislações como o Regulamento (CE) n.º 1333/2008 da União Europeia — coloca o urucum amazônico em posição estratégica, com potencial de valorização ainda subutilizado por limitações tecnológicas nos processos extrativos.

No que diz respeito aos métodos de extração, descrevem que maceração, lixiviação, extração supercrítica com CO_2, extração líquido-dispersiva, sonicação, extração enzimática e extração assistida por micro-ondas são os métodos mais utilizados para isolar bixina e norbixina, com limitações específicas para cada técnica emergente em termos de custo, escalonamento e consumo energético. A ausência de estudos que avaliem NADES como meio extrativo para bixina e norbixina de sementes de *B. orellana* representa, portanto, uma lacuna concreta e original. Do ponto de vista teórico, a bixina — composto apo-

carotenoide lipofílico — apresenta compatibilidade esperada com NADES hidrofóbicos baseados em mentol, enquanto a norbixina — polar e carregada negativamente em pH neutro — pode ser compatível com sistemas hidrofílicos ácidos, como colina:ácido láctico ou betaína:ácido cítrico [21].

1.3.2 *Genipa americana L.* (jenipapo): iridoides, pigmento azul e potencial biotecnológico

Genipa americana L. (família Rubiaceae), conhecida popularmente como jenipapo, é uma espécie frutífera nativa distribuída nos domínios fitogeográficos brasileiros, com maior prevalência no bioma amazônico. Nascimento e colaboradores em 2024 [22] compilaram 39 artigos e 11 patentes relativos à espécie, confirmando que os iridoides são seus metabólitos secundários mais característicos — especialmente genipina, ácido geniposídico e geniposídeo, os mais prevalentes no fruto.

A distribuição desses compostos varia de forma significativa entre as partes do fruto e os estágios de maturação. Identifica-se nove iridoides no fruto, incluindo ácido geniposídico, gardenosídeo, geniposídeo, genipina e derivados acilados. Os autores demonstraram que a genipina é o iridoide mais abundante no fruto imaturo (60,77 mg/g de massa seca), enquanto o fruto maduro é dominado por geniposídeo e ácido geniposídico (89,48 e 25,04 mg/g de massa seca, respectivamente) [23]. Uma redução superior a 90% no conteúdo total de iridoides durante o amadurecimento, o que explica a ausência de formação de pigmento azul no fruto maduro após dano tecidual. Esses dados estabelecem o fruto verde como a matéria-prima mais relevante para extração de genipina [24].

O perfil farmacológico da genipina é de amplitude notável. Descreve-se que a genipina é o iridoide não glicosídico ativo nos extratos de *Genipa americana*, responsável pelos efeitos anti-inflamatório e hepatoprotetor documentados in vitro e in vivo. Em testes celulares, sua atividade antiproliferativa foi demonstrada frente a múltiplas linhagens tumorais, com mecanismo atribuído à inibição específica da proteína UCP2 e à supressão da ativação de STAT3 — ambos alvos de relevância em oncologia translacional [25]. Complementa-se esse perfil ao demonstrar, por meio de análise de farmacologia de redes, potencial terapêutico da genipina em doença inflamatória intestinal, lesão pulmonar aguda, câncer, diabetes, depressão e doenças neurodegenerativas [26].

Além das atividades biológicas diretas, a genipina apresenta uma propriedade biotecnológica de alto valor agregado, sua capacidade de atuar como agente reticulante natural de baixa toxicidade para biopolímeros. Documenta-se que o óleo de jenipapo — extrato rico em genipina — demonstra elevado conteúdo fenólico, atividade antioxidante e antimicrobiana não hemolítica, com vantagem sobre a genipina comercial em pó, que não exibe atividade antioxidante. A capacidade reticulante da genipina foi validada para quitosana, gelatina, zeína e proteínas de batata, sinalizando mercados emergentes que vão de biomateriais a embalagens ativas e sistemas de encapsulamento farmacêutico [22].

Outra fator de relevância é a produção do pigmento azul natural. A reação espontânea da genipina com aminas primárias de proteínas — como lisina e glicina — forma dímeros e oligômeros de coloração azul-escura, cuja intensidade é proporcional à concentração de genipina livre disponível. Esse pigmento é utilizado tradicionalmente por grupos indígenas amazônicos como tinta corporal e têxtil, e tem sido investigado como alternativa ao azul sintético (indigotina) na indústria alimentícia, onde a ausência de pigmentos azuis naturais aprovados para uso em alimentos representa uma lacuna histórica. Confirmam-se que os iridoides do extrato de fruto imaturo de *G. americana* exibiram atividade antioxidante significativa (captação de radicais DPPH, ABTS e peroxila) e efeito citoestático frente a linhagens de glioma e câncer de mama, indicando que o fruto possui potencial dual como fonte de pigmento e como ingrediente funcional [23].

Sob a perspectiva dos métodos extrativos, os estudos disponíveis sobre *G. americana* baseiam-se predominantemente em extração pressurizada com etanol, extração enzimática assistida e maceração com solventes aquoso-alcoólicos. Foi documentado que a extração pressurizada com etanol a partir do endocarpo do jenipapo resultou na maior recuperação de genipina, enquanto o mesocarpo forneceu maior teor de geniposídeo; extratos do endocarpo e do mesocarpo apresentaram as maiores atividades antioxidantes pelos métodos FRAP e DPPH [27].

Não há, contudo, registros na literatura de estudos que avaliem NADES como meio extrativo para iridoides de *G. americana*. Considerando que NADES hidrofílicos ácidos — como colina:ácido cítrico, ácido láctico:glicose e betaína:ácido málico — possuem alta afinidade com compostos glicosídicos e terpênicos polares, classe à qual pertencem geniposídeo e ácido geniposídico, e que a genipina (iridoide aglicona de polaridade intermediária)

pode ser compatível com sistemas de polaridade ajustável, existe base teórica sólida para investigar essa aplicação. A dupla ausência de estudos — tanto para *B. orellana* quanto para *G. americana* com NADES — reforça a originalidade e a pertinência científica da pesquisa apresentada.

Diante desse cenário, esta dissertação parte da seguinte pergunta de pesquisa: os solventes eutéticos naturais (NADES) são capazes de extrair compostos bioativos de *Bixa orellana* e *Genipa americana* com eficiência comparável ou superior à dos solventes orgânicos convencionais, mantendo a integridade química e a bioatividade dos extratos obtidos? Responder a essa questão implica avançar em uma fronteira pouca explorada da química extrativa aplicada à biodiversidade amazônica, com implicações diretas para o desenvolvimento de processos mais seguros, sustentáveis e economicamente viáveis para espécies de alto potencial regional.

1.4 Objetivos

1.4.1 Geral

Otimização dos sistemas de solventes eutéticos naturais para a extração de compostos bioativos de frutos amazônicos (*Bixa orellana* e *Genipa americana*), avaliando o desempenho extrativo, a caracterização química e o potencial tecnológico dos extratos obtidos.

1.4.2 Específicos

- Avaliar preliminarmente o efeito de diferentes sistemas de solventes eutéticos naturais e sistemas controle na extração de carotenoides, compostos fenólicos e atividade antioxidante.
- Selecionar os sistemas eutéticos mais promissores com base no desempenho extrativo.
- Otimizar as condições de extração dos sistemas selecionados por meio de delineamento experimental Box–Behnken e metodologia de superfície de resposta.
- Caracterizar os sistemas eutéticos e os extratos otimizados por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).
- Avaliar os extratos otimizados quanto ao teor de compostos bioativos, atividade antioxidante e parâmetros físico-químicos, incluindo análise de cor.
- Encapsular os extratos otimizados e determinar a retenção e o perfil de liberação dos compostos bioativos.
- Avaliar a digestibilidade in vitro dos extratos encapsulados.

Capítulo 2

Fundamentação Teórica

A busca por alternativas sustentáveis aos solventes orgânicos convencionais, aliada à crescente valorização da biodiversidade amazônica como fonte de compostos bioativos, fundamenta as escolhas metodológicas desta dissertação. Este capítulo apresenta os embasamentos científicos organizados em cinco eixos: os fundamentos físico-químicos dos solventes eutéticos naturais (NADES), incluindo sua formação, propriedades e métodos de preparo; sua aplicação como solventes de extração de compostos bioativos; as propriedades dos compostos-alvo; o potencial fitoquímico das espécies amazônicas *Bixa orellana* e *Genipa americana*; e os princípios de encapsulação e digestibilidade in vitro dos extratos obtidos.

No contexto regulatório brasileiro, o uso de espécies amazônicas nativas exige conformidade com a Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015, que regulamenta o acesso ao patrimônio genético e ao conhecimento tradicional associado, e com o Decreto nº 8.772, de 11 de maio de 2016, que a regulamenta. Essas normativas estabelecem as condições de acesso, a obrigação de repartição de benefícios e os procedimentos de cadastro junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen), sendo de cumprimento obrigatório em pesquisas que envolvam recursos genéticos da biodiversidade brasileira [28, 29].

2.1 Solventes Eutéticos Naturais (NADES)

Os NADES emergem da família mais ampla dos solventes eutéticos profundos (DES) ao observar que certas misturas binárias de compostos sólidos produziam líquidos à temperatura ambiente [30]. A denominação "Natural"foi introduzida por Choi e colaboradores em 2011 [8] para distinguir sistemas compostos exclusivamente por metabólitos primários de origem biológica – açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos e álcoois de cadeia curta – daqueles baseados em reagentes sintéticos ou semissintéticos. Nos últi-

mos cinco anos, o número de publicações sobre extração com NADES cresceu de forma expressiva, com foco crescente em matrizes tropicais e biodiversas, reflexo do duplo apelo de sustentabilidade e eficiência que esses sistemas oferecem [31, 32].

2.1.1 Formação de Sistemas Eutéticos e Interações Intermoleculares

Um sistema eutético forma-se quando dois ou mais componentes, misturados em proporções estequiométricas específicas, produzem uma mistura com ponto de fusão inferior ao de qualquer um de seus constituintes puros. Esse fenômeno não resulta de uma reação química entre os componentes, mas da perturbação da estrutura cristalina de cada substância pela formação de fortes interações intermoleculares na mistura, que estabilizam preferencialmente a fase líquida em temperaturas mais baixas [30].

O mecanismo central dessa diminuição do ponto de fusão é o estabelecimento de ligações de hidrogênio entre um aceptor de ligação de hidrogênio (HBA, hydrogen bond acceptor) e um doador de ligação de hidrogênio (HBD, hydrogen bond donor). A rede supramolecular tridimensional resultante redistribui a energia do sistema, reduzindo a energia de rede cristalina de cada componente puro. Quanto maior o número de ligações de hidrogênio formadas e quanto mais complementar a geometria dos grupos interagentes, mais intensa é a depressão do ponto de fusão [31, 33].

A figura 2.1 ilustra de forma simplificada o mecanismo de formação de sistemas eutéticos, evidenciando o papel das interações entre HBA e HBD na desorganização da rede cristalina e na redução do ponto de fusão.

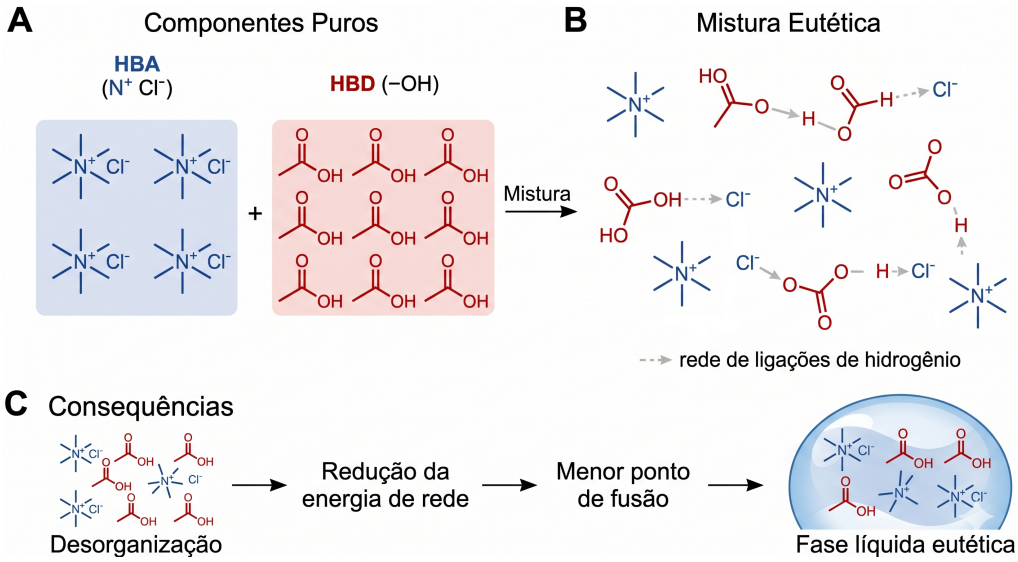


Figura 2.1 - Esquema simplificado da formação de sistemas eutéticos naturais (NADES) a partir de interações entre aceitadores (HBA) e doadores (HBD) de ligações de hidrogênio.

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Estudos computacionais por dinâmica molecular e pela Teoria do Funcional da Densidade (DFT) têm refinado a compreensão dessas interações. Simulações demonstraram que, em sistemas NADES baseados em ácido cítrico e açúcares, a rede de ligações de hidrogênio é mais densa e organizada do que em soluções aquosas equivalentes, o que explica a capacidade excepcional de solvatação desses solventes para moléculas polares e anfipáticas [32, 34]. Choi e seus colaboradores propuseram ainda que misturas eutéticas de metabólitos primários podem existir naturalmente no interior de células vegetais em condições de estresse hídrico, funcionando como meio de dissolução para metabólitos secundários de baixa solubilidade aquosa – hipótese que sustenta a compatibilidade intrínseca desses solventes com matrizes vegetais e confere aos NADES relevância biológica que vai além de sua aplicação tecnológica [8].

A diferença conceitual entre DES e NADES reside na origem e na biocompatibilidade dos componentes. Os DES convencionais frequentemente empregam cloreto de colina sintético ou ureia, compostos que, embora eficazes, apresentam restrições de uso em processos alimentares. Os NADES, por sua vez, são formados por compostos GRAS (Generally Recognized as Safe) ou metabolicamente relevantes, o que os torna intrinsecamente mais seguros e adequados para aplicações em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos [31, 35].

2.1.2 Classificação e Composição dos NADES

A classificação dos NADES organiza-se segundo a natureza química dos componentes e o tipo de interação HBA-HBD predominante. De acordo com Dai e autores [7], é estabelecida a taxonomia de referência, distinguindo sistemas do tipo: ácido orgânico–açúcar; ácido orgânico–aminoácido; açúcar–aminoácido; açúcar–álcool de cadeia curta; e colina–ácido orgânico. Revisões mais recentes ampliaram essa classificação para incluir sistemas ternários e quaternários e uma categoria adicional relevante: os DES hidrofóbicos (HDES) [31, 32].

Entre os açúcares mais utilizados estão glicose, frutose, sacarose, sorbitol, trealose e xilose. Sua múltipla hidroxilação os posiciona como HBDs eficientes, conferindo alta hidrofilicidade e capacidade de formação de redes extensas de ligações de hidrogênio. Os ácidos orgânicos – cítrico, málico, lático, oxálico, tartárico e succínico – funcionam simultaneamente como HBDs (grupos –COOH) e HBAs (oxigênios carbonílicos), conferindo-lhes versatilidade singular na formação de redes supramoleculares. Os aminoácidos – prolina, betaína, lisina, tirosina e ácido glutâmico – aportam grupos bifuncionais (amino e carboxílico) que ampliam a densidade de sítios de interação, com a betaína introduzindo adicionalmente interações eletrostáticas por sua natureza zwitteriônica [36].

Nos últimos anos, compostos fenólicos de baixo ponto de fusão – como timol, mentol e ácido ferúlico – passaram a integrar formulações de NADES funcionais, adicionando atividade antioxidante intrínseca ao solvente e ampliando as possibilidades de extração seletiva de compostos termossensíveis [37, 38].

Os DES hidrofóbicos (HDES) representam uma extensão relevante da família dos solventes eutéticos, especialmente para aplicações envolvendo compostos apolares como carotenoides. Ao contrário dos NADES hidrofílicos, os HDES apresentam baixo contato com a água e resistência à separação de fases em meio aquoso, com perda de sais de apenas cerca de 1,9% e conteúdo de água mínimo de aproximadamente 1,8% quando em contato com água. Esses atributos os tornam adequados para extração líquido-líquido de compostos lipofílicos e para aplicações em biotecnologia e nanotecnologia [32]. Sua síntese envolve componentes como sais de amônio quaternário e compostos orgânicos hidrofóbicos – incluindo monoterpenos naturais como timol e mentol emparelhados com ácidos

orgânicos de cadeia longa –, que conferem hidrofobicidade e estabilidade em ambientes aquosos.

2.1.3 Métodos de Preparo e Caracterização dos NADES

Uma das razões para o crescente interesse nos NADES é a diversidade de métodos disponíveis para sua preparação. Atualmente, são reconhecidas pelo menos sete abordagens principais, sendo a mais comum aquela que combina aquecimento e agitação [31]. A escolha do método depende de fatores como a sensibilidade térmica dos compostos e a necessidade de um processo rápido ou mais controlado:

- Aquecimento e agitação: consiste em misturar os constituintes em proporções estequiométricas sob aquecimento brando (50–80°C) e agitação contínua até a formação de uma mistura homogênea e transparente. É o método mais utilizado pela sua simplicidade e reprodutibilidade.

- Moagem: indicado para componentes sensíveis ao calor. O processo ocorre em temperatura ambiente, utilizando almofariz e pistilo até a formação de um líquido translúcido, evitando a degradação de substâncias termolábeis.

- Extrusão de parafuso duplo: realiza a mistura e trituração contínuas dos constituintes usando uma extrusora de parafuso duplo, com potencial de escalonamento para produção em maior escala.

- Liofilização: os constituintes são dissolvidos em água destilada, a solução é congelada e liofilizada. É especialmente útil para reagentes termossensíveis ou quando se deseja eliminar completamente a água residual.

- Evaporação a vácuo: os constituintes são dissolvidos em água e a água é eliminada por evaporação rotativa, com secagem posterior em dessecador, produzindo NADES com teor de umidade controlado.

- Irradiação por micro-ondas: método rápido em que os constituintes são misturados e irradiados em micro-ondas por curtos períodos, acelerando a homogeneização com menor gasto energético.

- Preparação assistida por ultrassom: os constituintes são misturados e submetidos a banho ultrassônico, garantindo homogeneização eficiente, especialmente para misturas com componentes de difícil miscibilidade.

Após a preparação, os NADES são caracterizados por técnicas analíticas complementares. A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e a ressonância magnética nuclear (RMN) são as mais empregadas para confirmar a formação de ligações de hidrogênio entre os componentes e validar a estrutura do sistema eutético obtido. A RMN de prótons (^{1}H RMN), em particular, permite investigar as propriedades estruturais e físico-químicas dos NADES, como deslocamentos químicos indicativos de interações intermoleculares específicas [32]. Abordagens computacionais – como DFT e dinâmica molecular – complementam os dados experimentais ao modelar as interações a nível atômico, permitindo prever propriedades físico-químicas e guiar o design racional de novas formulações de NADES [31, 34].

2.1.4 Propriedades Físico-químicas Relevantes

As propriedades físico-químicas dos NADES são determinantes para seu desempenho como solventes de extração e dependem fortemente da composição e da razão molar dos componentes. A viscosidade é a propriedade mais citada como fator limitante - à temperatura ambiente, a maioria dos NADES apresenta valores entre 10 e 500 mPa·s – até três ordens de magnitude superiores à da água. Essa característica reduz a difusividade molecular e a taxa de transferência de massa durante a extração, mas pode ser atenuada pela adição controlada de água (até aproximadamente 50% v/v sem comprometer o caráter eutético) ou pelo aumento da temperatura de extração [32, 39].

A polaridade dos NADES, frequentemente expressa pelos parâmetros de Kamlet-Taft (α, β e π^*), é altamente ajustável com a composição. Sistemas ricos em ácidos orgânicos curtos apresentam maior capacidade doadora de próton (α elevado), enquanto sistemas baseados em açúcares exibem alta capacidade aceptora (β elevado). A constante dielétrica dos NADES é geralmente alta (entre 20 e 80), favorecendo a solubilização de compostos iônicos e polares [40]. A atividade de água (aw) dos NADES é significativamente inferior à da água pura, com consequências importantes para a estabilidade microbiológica dos extratos e para a minimização de reações de hidrólise indesejáveis

durante extração e armazenamento [36].

A estabilidade térmica dos NADES de origem natural situa-se tipicamente entre 60 e 100°C, compatível com a maioria dos processos de extração. Acima desses limites, reações de degradação – como caramelização de açúcares e desidratação de ácidos orgânicos – podem comprometer a qualidade do solvente e do extrato. A densidade dos NADES é geralmente superior à da água (1,1 a 1,4 g/cm^3), característica que influencia a dinâmica de separação de fases em sistemas de extração líquido-líquido [32, 33].

2.1.5 Vantagens e Limitações Tecnológicas

Os NADES apresentam um conjunto consolidado de vantagens que os posiciona como alternativa relevante aos solventes orgânicos convencionais e aos líquidos iônicos. Do ponto de vista ambiental, são biodegradáveis, produzidos a partir de matérias-primas renováveis e, em sua maioria, classificados como GRAS pela agência reguladora americana (do inglês Food and Drug Administration - FDA). Em comparação com solventes orgânicos – metanol, etanol, acetona, hexano –, os NADES oferecem menor pressão de vapor (reduzindo riscos de inflamabilidade), maior seletividade de extração para compostos polares e ausência de resíduos tóxicos nos extratos. Frente aos líquidos iônicos, levam vantagem em custo, disponibilidade de matéria-prima, síntese simples (mistura direta sem reagentes auxiliares) e perfil toxicológico mais favorável, uma vez que líquidos iônicos frequentemente apresentam toxicidade a organismos aquáticos [31, 40].

As principais limitações que ainda desafiam a aplicação industrial dos NADES são: (a) a elevada viscosidade à temperatura ambiente, que prejudica a transferência de massa, a filtração e o bombeamento; (b) a dificuldade de separação do solvente do extrato após o processo, já que os componentes dos NADES não são voláteis e não podem ser removidos por evaporação convencional – estratégias como diálise, ultrafiltração, extração em fase sólida e precipitação seletiva têm sido investigadas, mas nenhuma consolidou-se como solução universal em escala industrial; e (c) a dificuldade de padronização da composição, visto que pequenas variações na razão molar ou na pureza dos componentes podem alterar completamente as propriedades físico-químicas do sistema, comprometendo a reprodutibilidade dos resultados [31, 37, 38].

2.2 Aplicação de NADES na Extração de Compostos Bioativos

A aplicação de NADES como solventes de extração de compostos bioativos de matrizes vegetais registrou crescimento expressivo nos últimos cinco anos. Revisões abrangentes documentam centenas de estudos em matrizes diversas, com interesse crescente em frutas tropicais, especiarias e espécies medicinais de regiões biodiversas, incluindo a Amazônia [37, 38, 40]. A capacidade de extrair simultaneamente compostos de diferentes polaridades, sem deixar resíduos tóxicos no extrato, é um dos atributos que mais impulsionam essa tendência no setor alimentar e farmacêutico.

2.2.1 Interações Soluto-solvente na Extração de Bioativos

A eficácia dos NADES na extração de compostos bioativos resulta de interações moleculares específicas entre os grupos funcionais do solvente e os dos compostos-alvo. Para compostos fenólicos, os mecanismos predominantes são as ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila dos fenólicos e os grupos doadores/aceptores do NADES; as interações π-π entre os anéis aromáticos dos fenólicos e estruturas conjugadas dos componentes do solvente; e as interações hidrofóbicas que estabilizam a porção apolar de fenólicos de maior peso molecular na rede do solvente. Essa multiplicidade de interações explica a alta afinidade de NADES baseados em ácido cítrico, glicose e prolina por ácidos fenólicos, flavonoides e antocianinas [37, 38, 41].

A seletividade de extração é a propriedade que mais diferencia os NADES dos solventes convencionais de uso amplo. Ao ajustar a composição do solvente, é possível favorecer a solubilização de classes específicas de compostos, reduzindo a co-extração de interferentes. Estudos com matrizes tropicais demonstraram que NADES formulados com ácidos orgânicos de cadeia curta extraem preferencialmente fenólicos de polaridade média (ácidos hidroxicinâmicos, flavonóis), enquanto sistemas mais ricos em açúcares favorecem compostos mais polares como antocianinas e ácidos hidroxibenzoicos [40].

Para compostos lipofílicos, como carotenoides, a solubilização em NADES exige ajustes de composição. A adição de quantidades controladas de água (tipicamente 20–40% v/v) reduz a polaridade global do sistema e pode melhorar a dispersão de compostos

apolares até um ponto ótimo, além do qual o excesso hídrico dilui as interações eutéticas. O uso de HDES – como sistemas baseados em timol e mentol – representa uma alternativa direta para extração de compostos lipofílicos, aproveitando a afinidade hidrofóbica do solvente pelos pigmentos [32, 39].

2.2.2 Fatores que Influenciam o Desempenho da Extração

O desempenho da extração com NADES é determinado pela interação entre variáveis do solvente e variáveis operacionais do processo. A temperatura é a variável de maior impacto individual, seu aumento reduz a viscosidade do NADES, melhora a difusividade dos solutos e favorece a disrupção das paredes celulares da matriz vegetal. Para matrizes amazônicas, temperaturas entre 40 e 80°C têm sido reportadas como adequadas para a maioria dos fenólicos, enquanto carotenoides termolábeis – como bixina – podem exigir faixas mais estreitas para preservar a integridade estrutural dos pigmentos [40, 42].

A razão solvente/matriz (mL de NADES por g de matriz seca) controla a capacidade de dissolução do sistema. Razões insuficientes resultam em saturação do solvente antes que o equilíbrio de transferência de massa seja atingido; razões excessivas aumentam volume de solvente sem ganho proporcional em rendimento. Para matrizes ricas em fenólicos, razões entre 10:1 e 30:1 são comumente eficazes, mas esse valor é dependente da composição do NADES e da natureza da matriz [41].

O teor de água no NADES exerce influência dupla, reduz a viscosidade e melhora a cinética de transferência de massa, mas, em excesso, dilui a rede supramolecular e pode comprometer a seletividade da extração. Dai e seus colaboradores [39] demonstraram que a adição de até aproximadamente 50% de água (v/v) mantém as propriedades eutéticas na maioria dos sistemas, enquanto teores superiores resultam em comportamento assemelhado ao de soluções aquosas convencionais.

O tempo de extração influencia o rendimento até que o equilíbrio de transferência de massa seja atingido. A aplicação de técnicas assistidas por energia – especialmente a extração assistida por ultrassom (UAE) e a extração assistida por micro-ondas (MAE) – reduz significativamente o tempo necessário sem elevar a temperatura a ponto de degradar compostos termolábeis. No caso do ultrassom, o fenômeno de cavitação acústica gera microbolhas que colapsam próximas à superfície da matriz, produzindo ondas de

choque e cisalhamento localizado que rompem as paredes celulares e aceleram a difusão dos compostos para o solvente. A combinação de UAE com NADES é apontada como uma das abordagens mais promissoras para extrações com alta eficiência e menor consumo energético [40].

2.2.3 Otimização de Processos Extrativos

A multiplicidade de variáveis que afetam a extração com NADES – temperatura, tempo, teor de água, razão solvente/matriz e composição do solvente – e a presença de interações entre elas tornam indispensável o uso de delineamentos estatísticos multivariados. A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) é a abordagem mais amplamente empregada, por permitir modelar relações quadráticas entre variáveis independentes e respostas de interesse com número de experimentos muito inferior ao exigido por delineamentos fatoriais completos [43].

O delineamento de Box-Behnken (BBD) destaca-se entre os delineamentos de superfície de resposta por não incluir pontos nos vértices do hipercubo experimental – eliminando a necessidade de testar condições extremas simultâneas em todas as variáveis –, por empregar apenas três níveis por variável e por apresentar estrutura quase rotativa, garantindo estimativas precisas dos parâmetros do modelo em toda a região experimental. Essas características o tornam especialmente adequado para estudos de otimização de extrações com NADES de matrizes vegetais tropicais [43].

As variáveis-resposta mais frequentes nos estudos publicados entre 2020 e 2024 sobre extração de bioativos com NADES incluem o teor de fenólicos totais (método de Folin-Ciocalteu), atividade antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP) e concentração de compostos-alvo por HPLC-DAD ou LC-MS. A validação dos modelos é realizada por ANOVA, coeficiente de determinação ajustado (R^2adj), teste de falta de ajuste (lack of fit) e confirmação experimental do ponto ótimo predito [40, 43].

2.3 Compostos Bioativos de Interesse

Os compostos bioativos de interesse neste trabalho pertencem a dois grandes grupos: compostos fenólicos, de natureza hidrofílica variável, e carotenoides, predominante-

mente lipofílicos. Ambos estão presentes nas espécies amazônicas estudadas e apresentam atividade antioxidante documentada, além de outras bioatividades de interesse industrial e nutricional. A crescente preferência por antioxidantes naturais, em oposição a variantes sintéticas, tem impulsionado a pesquisa e o desenvolvimento de ingredientes mais seguros e eficazes, o que sustenta diretamente o interesse tecnológico em ambas as classes [44].

2.3.1 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos constituem a classe de metabólitos secundários mais amplamente distribuída no reino vegetal, com mais de oito mil estruturas descritas. A unidade estrutural básica compartilhada é um ou mais anéis aromáticos com grupos hidroxila substituintes, cuja presença é responsável tanto pelas propriedades antioxidantes quanto pelas interações com os componentes dos NADES durante a extração. A principal divisão distingue os ácidos fenólicos – derivados dos ácidos hidroxibenzoico (C6-C1) e hidroxicinâmico (C6-C3) – dos flavonoides, de estrutura C6-C3-C6 [45, 46].

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos opera por três mecanismos principais: transferência de átomo de hidrogênio (HAT, do inglês Hydrogen Atom Transfer), pela qual o grupo –OH fenólico cede um hidrogênio a um radical livre; transferência de elétron acoplada a próton; e quelação de metais de transição pró-oxidantes, como Fe^{2+} e Cu^{2+}, que catalisam a geração de radicais via reação de Fenton. A eficácia antioxidante depende da estrutura molecular, compostos com substituição catecólica no anel B – dois grupos –OH em posições orto adjacentes, como na quercetina e no ácido cafeico – apresentam estabilização do radical fenoxílico por ressonância e quelação bidentada de metais [45].

No contexto amazônico, fenólicos de espécies nativas têm concentrado atenção crescente. Paes e colaboradores [44] documentaram fitoquímicos de espécies amazônicas com potencial nefroprotetor, evidenciando a amplitude das bioatividades associadas a fenólicos da região. Já havia-se demonstrado que frutos amazônicos apresentam capacidade antioxidante superior à de muitos frutos temperados comercialmente consolidados – evidência que reforça o interesse por tecnologias extrativas eficientes e gentis para preservar o potencial bioativo dessas matrizes [47].

2.3.2 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos terpenoides lipossolúveis, de coloração amarela a vermelha, biossintetizados por plantas, algas e microrganismos fotossintéticos. Seu esqueleto básico é um tetraterpenoide de 40 carbonos – exceto no caso de diapocarotenoides como bixina e norbixina, de 25 carbonos –, construído por condensação de unidades de isopreno (C5). A característica estrutural mais relevante é a cadeia central de duplas ligações carbono-carbono conjugadas (cadeia poliênica), responsável tanto pela absorção de luz visível quanto pelas propriedades antioxidantes do grupo [48, 49].

A atividade antioxidante dos carotenoides manifesta-se principalmente pela capacidade de desativar o oxigênio singlete ($^1O_2$) por transferência de energia física, convertendo-o à forma tripleta menos reativa. Esse mecanismo é especialmente eficaz em ambientes lipídicos, como membranas celulares e emulsões alimentares. Além disso, carotenoides podem reagir com radicais peroxila e interromper cadeias de peroxidação lipídica, especialmente em baixas pressões parciais de oxigênio. Carotenoides com anel β-ionona não substituído – β-caroteno, α-caroteno e β-criptoxantina – apresentam adicionalmente atividade pró-vitamínica A [49].

A lipofilicidade intrínseca e a sensibilidade da cadeia poliênica a agentes oxidantes, luz UV e calor constituem as principais limitações tecnológicas do grupo. Isomerização trans→cis, epoxidação e clivagem oxidativa da cadeia resultam em perdas de cor, atividade biológica e valor nutricional – reações favorecidas durante extração com solventes polares e processamentos com calor e oxigênio. Isso reforça a necessidade de condições extrativas controladas (como NADES com UAE em temperatura moderada) e de sistemas de proteção pós-extração como a encapsulação [40, 48].

2.4 Espécies Amazônicas Estudadas

A Amazônia concentra estimativas de 10 a 15% da biodiversidade vegetal global. A valorização de espécies nativas por meio de tecnologias de extração sustentável representa estratégia de alto impacto para o desenvolvimento econômico regional com base na conservação da sociobiodiversidade – eixo que, no Brasil, encontra amparo legal na Lei nº 13.123/2015 e no Decreto nº 8.772/2016, que regulamentam o acesso ao patrimônio

genético e ao conhecimento tradicional associado [28, 29]. *Bixa orellana* e *Genipa americana* inserem-se nesse contexto como espécies com perfis bioativos bem caracterizados, relevância cultural estabelecida e potencial tecnológico ainda em expansão, tendo ambas sido destacadas como fontes de corantes naturais de grande importância para o território amazônico [50].

2.4.1 *Bixa orellana*

Bixa orellana L. (Bixaceae), conhecida como urucum, annatto ou colorau, é uma espécie arbustiva nativa da América tropical amplamente cultivada na região Amazônica. A domesticação do urucum a partir de Bixa urucurana na Amazônia foi documentada por Moreira e colaboradores em 2015 [51], que relacionaram sua diversificação genética a processos de seleção por populações indígenas ao longo de milênios – dado que reforça o componente de conhecimento tradicional associado ao uso da espécie. Os frutos (figura 2.2) são cápsulas com espinhos moles que encerram sementes cobertas por uma camada de células secretoras ricas em pigmentos carotenoides – de onde são extraídos os compostos de maior interesse industrial.

Os compostos bioativos mais importantes de *B. orellana* são a bixina e a norbixina, carotenoides de estrutura atípica. Diferentemente da maioria dos carotenoides de 40 carbonos, bixina e norbixina são diapocarotenoides de 25 carbonos, formados pela clivagem oxidativa da cadeia poliênica do β-caroteno. A bixina possui um grupo metil éster em uma extremidade e um grupo carboxílico livre na outra, conferindo-lhe caráter lipofílico e coloração alaranjada intensa. A norbixina, obtida por saponificação da bixina, apresenta dois grupos carboxílicos livres e é mais hidrofílica – característica explorada em aplicações aquosas e em emulsões [42].

A bixina corresponde a 70–80% dos pigmentos totais das sementes e é utilizada como corante natural (código E160b/INS 160b) em queijos, margarinas, sobremesas, salgadinhos e bebidas. A crescente demanda por substitutos de corantes sintéticos, impulsionada por pressão regulatória e preferência do consumidor, combinada às evidências de bioatividade dos carotenoides do urucum (atividade antioxidante, antiproliferativa e anti-inflamatória), intensifica a busca por tecnologias extrativas mais eficientes e seguras. A extração convencional com hexano e acetona ou soluções alcalinas apresenta limitações de

segurança e sustentabilidade que os NADES e HDES buscam superar, mantendo a capacidade de dissolver os compostos bioativos sem alterar suas características e melhorando a solubilidade e estabilidade dos compostos extraídos [42, 50].



Figura 2.2 - Frutos e sementes de urucum (*Bixa orellana*).
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Além de bixina e norbixina, sementes de *B. orellana* contêm tocotrienóis (formas de vitamina E), compostos fenólicos (ácido gálico, ácido elágico, catequinas), fitoesteróis e terpenoides. Essa complexidade fitoquímica significa que a extração com NADES pode potencialmente capturar múltiplas classes de compostos simultaneamente, ampliando o perfil bioativo e tecnológico do extrato obtido em relação às extrações seletivas com solventes convencionais.

2.4.2 *Genipa americana*

Genipa americana L. (Rubiaceae), conhecida como jenipapo, é uma espécie arbórea com ampla distribuição na Amazônia, no Cerrado e nas matas de galeria do Brasil. O fruto (figura 2.3) é uma baga de casca lenhosa, polpa suculenta e adstringente, consumido in natura ou processado na forma de sucos, licores, vinhos, geleias e sorvetes. O suco do fruto verde é utilizado por diversas etnias indígenas amazônicas como corante permanente para pintura corporal e de tecidos, o que confere à espécie relevância cultural singular e destaca o potencial da genipina como corante natural multifuncional de origem amazônica [47,50].



Figura 2.3 - Frutos de jenipapo (*Genipa americana*).
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Do ponto de vista fitoquímico, os iridoides são os compostos de maior interesse científico de *G. americana*. Os iridoides são monoterpenoides glicosilados de estrutura

bicíclica, dos quais o geniposídeo é o mais abundante nos frutos. A hidrólise enzimática do geniposídeo gera a genipina, um agliconeo de alta reatividade química, em contato com grupos amino livres de aminoácidos, proteínas ou quitosana, a genipina forma espontaneamente pigmentos azul-escuros por reações de cross-linking intermolecular que envolvem abertura do anel e polimerização [52]. Essa propriedade posiciona a genipina como agente de reticulação natural em sistemas de encapsulação, substituindo reagentes sintéticos tóxicos como o glutaraldeído, e representa um dos principais diferenciais tecnológicos da espécie.

Além dos iridoides, frutos de *G. americana* contêm ácidos fenólicos (clorogênico, neoclorogênico), flavonoides (rutina, quercetina), ácido ascórbico e ácidos orgânicos que contribuem para o perfil antioxidante total da espécie. Rufino e colaboradores [47] confirmaram a elevada capacidade antioxidante do jenipapo entre espécies frutíferas brasileiras não tradicionais. Foram incluídos fitoquímicos de espécies amazônicas correlatas no escopo de compostos com bioatividades emergentes, evidenciando a continuidade do interesse científico na região. A diversidade química de *G. americana* – compostos de polaridades distintas, desde iridoides polares até flavonoides de polaridade intermediária – é argumento adicional a favor do uso de NADES como solventes de extração capazes de cobrir um espectro mais amplo de compostos-alvo em uma única etapa [44].

2.5 Encapsulação e Digestibilidade de Compostos Bioativos

A extração de compostos bioativos com NADES representa a primeira etapa de um processo mais amplo de desenvolvimento de ingredientes funcionais. Os extratos obtidos frequentemente contêm compostos instáveis em condições de processamento e armazenamento, com biodisponibilidade oral limitada ou características sensoriais indesejáveis. A encapsulação surge como estratégia integradora que protege os compostos extraídos, controla sua liberação no trato gastrointestinal e aumenta sua bioacessibilidade.

2.5.1 Encapsulação de Compostos Bioativos

A encapsulação consiste no aprisionamento de um material ativo – denominado núcleo ou fase interna – em uma estrutura protetora chamada parede ou material encapsulante. O objetivo principal é proteger o núcleo contra degradação química e física

durante o processamento, o armazenamento e a passagem pelo trato gastrointestinal. Os mecanismos de degradação que a encapsulação busca minimizar incluem a oxidação lipídica – especialmente relevante para carotenoides –, a foto-oxidação, a hidrólise ácida em pH gástrico e as reações de Maillard. A barreira física do material de parede retarda a difusão de oxigênio, umidade e pró-oxidantes em direção ao núcleo, estendendo a vida útil do bioativo [53, 54].

Além da proteção, a encapsulação pode mascarar sabores ou aromas indesejáveis, converter extratos líquidos em pós de fácil manuseio, melhorar a dispersibilidade de compostos lipofílicos em sistemas aquosos e controlar a taxa e o espaço de liberação no trato gastrointestinal. A secagem por aspersão (spray drying) é a técnica mais aplicada industrialmente para compostos bioativos de origem vegetal, por seu baixo custo operacional, alta produtividade, controle de tamanho e morfologia das partículas e ampla disponibilidade de equipamentos em escala industrial [54].

2.5.2 Materiais de Parede em Sistemas Encapsulados

A seleção do material de parede é determinante para as propriedades funcionais das partículas encapsuladas. Os critérios de escolha incluem compatibilidade química com o núcleo, capacidade de formação de filme ou matriz coesa, solubilidade nas condições de processo, estabilidade durante o armazenamento e perfil de liberação desejado no trato gastrointestinal [53].

A maltodextrina é um produto de hidrólise parcial do amido, constituído por cadeias de glicose de grau de polimerização variável, caracterizado pelo equivalente de dextrose (DE). Apresenta alta solubilidade em água, baixa viscosidade em concentrações de uso (facilitando a atomização), excelente capacidade de formação de matriz amorfa durante a secagem por aspersão, baixo custo e ampla disponibilidade. Sua principal limitação é a baixa atividade emulsificante intrínseca, o que pode comprometer o encapsulamento de compostos lipofílicos na ausência de agentes emulsificantes auxiliares [54].

A goma arábica (GA) é um polissacarídeo complexo ramificado obtido como exsudado de espécies de Acacia (principalmente *A. senegal* e *A. seyal*). Sua estrutura molecular – formada por galactose, arabinose, ramnose e ácido glucurônico, associados a uma fração proteica de 2–3% denominada arabinogalactana-proteína – confere à GA

propriedades emulsificantes e de estabilização coloidal únicas. A fração proteica ancora-se na interface óleo-água, enquanto as cadeias polissacarídicas formam um filme viscoelástico que impede coalescência e oxidação das gotículas lipídicas [54].

A combinação de maltodextrina e goma arábica é uma das formulações de parede mais estudadas para encapsulação de pigmentos lipofílicos. Essa combinação aproveita a complementaridade entre a capacidade de formação de matriz da maltodextrina e a capacidade emulsificante da GA, resultando em partículas com maior eficiência de encapsulação e melhor estabilidade oxidativa do núcleo do que os materiais isolados. Estudos com carotenoides de matrizes tropicais confirmaram que proporções de 1:1 a 3:1 de maltodextrina e GA produzem partículas com morfologia regular, baixa permeabilidade ao oxigênio e boa retenção de pigmentos durante o armazenamento [54, 55].

2.5.3 Liberação dos Compostos Bioativos

A liberação de compostos bioativos a partir de sistemas encapsulados é governada por três mecanismos principais, atuando simultaneamente em graus variáveis: (a) difusão do núcleo pela matriz polimérica – predominante em matrizes densas e não solúveis, obedecendo à primeira lei de Fick; (b) dissolução ou erosão da parede – dominante em sistemas produzidos com polissacarídeos hidrossolúveis, como maltodextrina e GA, que absorvem água progressivamente ao entrar em contato com o meio gastrointestinal; e (c) ruptura física ou química da cápsula por variações de pH, temperatura ou compressão mecânica [54, 55].

A taxa de dissolução da parede é sensível ao pH, temperatura e força iônica do meio, permitindo projetar sistemas com liberação preferencial em segmentos específicos do trato gastrointestinal. A goma arábica apresenta relativa resistência à digestão péptica em condições ácidas, tornando-a especialmente adequada em sistemas bipartidos com maltodextrina para liberação intestinal preferencial de compostos fenólicos e carotenoides. Para carotenoides, a liberação na porção duodenal/jejunal – onde sais biliares concentram-se para emulsificação lipídica – é determinante para a bioacessibilidade [48, 54].

2.5.4 Digestibilidade In Vitro

Os modelos de digestão simulada in vitro são ferramentas consolidadas para avaliar o comportamento de compostos bioativos e de sistemas encapsulados ao longo do trato gastrointestinal, sem a necessidade de ensaios com animais ou humanos. O protocolo estático padronizado pelo INFOGEST [56], e atualizado na versão INFOGEST 2.0 [57], representa o padrão metodológico atual para digestão in vitro de alimentos. A versão 2.0 incorpora refinamentos para aumentar a fidelidade fisiológica, incluindo a etapa oral com amilase e ajustes nas condições de bile e pancreatina intestinal, permitindo comparação direta de resultados entre diferentes grupos de pesquisa.

A fase gástrica é conduzida com pepsina em pH 2,0 a 3,0 por 2 horas, simulando o ambiente ácido e proteolítico do estômago. Para fenólicos, essa fase pode promover hidrólise parcial de ésteres e glicosídeos, liberando formas mais facilmente absorvíveis. Para carotenoides, o pH ácido não degrada diretamente o pigmento, mas a ausência de sais biliares limita a solubilização micelar durante essa fase. A fase intestinal é realizada com pancreatina e sais biliares em pH 7,0 a 7,4 por 2 horas, simulando a ação hidrolítica e a emulsificação no intestino delgado – fase em que a solubilização micelar dos carotenoides e a absorção de fenólicos são predominantemente avaliadas [57].

A bioacessibilidade é definida como a fração do composto bioativo que, após a digestão simulada, encontra-se na fração micelar solúvel do digerido e, portanto, disponível para absorção pelo epitélio intestinal. Para compostos lipofílicos como carotenoides, esse parâmetro depende criticamente da formação de micelas mistas com sais biliares, monoacilgliceróis e ácidos graxos livres. A presença de lipídios no sistema de encapsulação pode aumentar substancialmente a bioacessibilidade de carotenoides, por favorecer a formação de micelas ricas em pigmento durante a digestão intestinal. Estudos com pigmentos de matrizes tropicais indicam que a encapsulação com maltodextrina e GA pode aumentar a bioacessibilidade de carotenoides em 2 a 5 vezes em relação ao extrato bruto e proteger fenólicos da degradação gástrica, aumentando a fração disponível na fase intestinal [54,57].

Capítulo 3

Seleção e caracterização de solventes eutéticos naturais para a extração de compostos bioativos de *Bixa orellana* e *Genipa americana*

3.1 Introdução

A obtenção de compostos bioativos a partir de matrizes vegetais depende diretamente da escolha do solvente de extração, que condiciona tanto o rendimento quanto o perfil qualitativo do extrato. Solventes orgânicos convencionais, como metanol, hexano e acetona, são utilizados nesse contexto, mas apresentam limitações bem documentadas: toxicidade, volatilidade elevada, geração de resíduos nocivos e restrições regulatórias crescentes para aplicações alimentares e farmacêuticas [10]. Essa realidade tem impulsionado a busca por alternativas mais seguras e ambientalmente compatíveis, entre as quais os solventes eutéticos naturais (NADES, do inglês Natural Deep Eutectic Solvents) se destacam nas últimas duas décadas.

Os NADES são misturas de dois ou mais componentes naturais — geralmente um aceptor e um doador de ligações de hidrogênio — que formam líquidos com ponto de fusão inferior ao de cada constituinte isolado [7, 8]. Sua composição tipicamente inclui açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, poliálcoois e sais de amônio quaternário, todos de origem biológica e com baixa toxicidade. Essas características conferem aos NADES um perfil favorável à extração de biomoléculas, conciliando seletividade, biodegradabilidade e compatibilidade com matrizes alimentares e farmacológicas [13, 58]. Contudo, o desempenho extrativo de um NADES não é universal: ele varia de acordo com a polaridade do sistema, a razão molar entre os componentes, o teor de água incorporado e as propriedades estruturais dos compostos-alvo [10]. Sistemas com alta polaridade, como

cloreto de colina:glicerol ou betaína:ácido cítrico, mostram melhor desempenho para compostos fenólicos e antocianinas, enquanto formulações menos polares são mais adequadas para carotenoides e compostos lipofílicos [59].

Essa dependência de variáveis físico-químicas torna a seleção do sistema solvente uma etapa crítica antes de qualquer processo de otimização. A avaliação preliminar de diferentes NADES, por meio de análises de fenóis totais, carotenoides e capacidade antioxidante dos extratos obtidos, funciona como uma triagem necessária para identificar os sistemas com maior potencial extrativo. Paralelamente, a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) tem sido amplamente empregada como ferramenta de caracterização estrutural dos NADES, permitindo confirmar a formação de interações intermoleculares — sobretudo ligações de hidrogênio entre os componentes da mistura — e verificar a identidade e a estabilidade do sistema formado [59, 60]. O deslocamento de bandas características, especialmente na região de estiramento O–H ($\sim$3000–3600 cm^{-1}) e de deformação C=O ($\sim$1700 cm^{-1}), em relação aos espectros dos componentes puros, é evidência direta da formação da rede supramolecular que define o comportamento eutético.

No contexto amazônico, *Bixa orellana L.* (urucum) e *Genipa americana L.* (jenipapo) são espécies de reconhecido valor biológico. A primeira se destaca como fonte de carotenoides — em especial bixina e norbixina — além de apresentar flavonoides e ácidos fenólicos em sementes e folhas com atividades antioxidante, antimicrobiana e antidiabética documentadas [19,61]. A segunda contém iridoides, ácidos fenólicos e polissacarídeos com atividades antioxidante, antiproliferativa e neuroprotetora, encontrados em polpa, casca e folhas do fruto [22, 23, 62]. Apesar do potencial comprovado dessas espécies, os estudos voltados à extração verde de seus compostos bioativos ainda são escassos, e a aplicação de NADES nessas matrizes permanece praticamente inexplorada. Faria e colaboradores [63] demonstraram que o método de extração influencia diretamente o perfil fenólico do jenipapo, o que reforça a pertinência de investigar solventes alternativos para essa espécie.

Até o momento, não foram identificados estudos que comparem sistematicamente diferentes formulações de NADES para a extração de bioativos de *B. orellana* e *G. americana*, especialmente em abordagem comparativa e com foco regional amazônico. Essa

lacuna justifica a proposta deste capítulo, cujos objetivos são avaliar preliminarmente o efeito de diferentes sistemas NADES e sistemas controle na extração de carotenoides, compostos fenólicos e atividade antioxidante de *B. orellana* e *G. americana*; e selecionar os sistemas eutéticos mais promissores com base no desempenho extrativo, estabelecendo o fundamento necessário para as etapas subsequentes de otimização.

3.2 Materiais

3.2.1 Reagentes Químicos

Os sistemas eutéticos naturais (NADES) estudados foram preparados por meio da mistura dos reagentes timol (⩾99.0% da Synth), cloreto de colina (⩾99.0% da Sigma-Aldrich), ácido lático (85.0 - 90.0% da Synth), D-sorbitol (97% da Dinâmica Química®), e glicerol (⩾99.0% da Sigma-Aldrich). Além disso, foram empregados etanol (99.5% da Nuclear) e metanol (99.8% da Dinâmica Química®) para a preparação de solventes hidroalcoólicos, os quais foram utilizados a fim de comparar o efeito de solventes convencionais e mais verdes nos ensaios.

As informações detalhadas sobre os reagentes são apresentadas na tabela 3.1. Também foram utilizados reagentes de grau analítico para a determinação de compostos bioativos e avaliação da atividade antioxidante.

Tabela 3.1 - Descrição dos reagentes químicos.

Reagentes	**Peso Molar** ($\mathbf{g.mol^{-1}}$)	**Fabricante**	**Nº CAS**	**Pureza*** (%)
Ácido L-Lático	90,08	Synth	79-33-4	85.0 - 90.0
Álcool Etílico Absoluto	46,07	Nuclear	64-17-5	99.5
Álcool Metílico	32,04	Dinâmica Química®	67-56-1	99.8
Cloreto de Colina	139,62	Sigma-Aldrich	67-48-1	⩾ 99.0
D-Sorbitol	182,17	Dinâmica Química®	50-70-4	97
Glicerol	92,09	Sigma-Aldrich	56-81-5	⩾ 99.0
Timol	150,22	Synth	89-83-8	⩾ 99.0

*Todos os valores de pureza foram fornecidos pelos fabricantes.

3.2.2 Espécies Vegetais

As espécies vegetais selecionadas para este estudo foram *Bixa orellana L.* (urucum) e *Genipa americana L.* (jenipapo), escolhidas em função do seu potencial como fontes de compostos bioativos e pigmentos naturais. O urucum foi coletado na fase madura, enquanto o jenipapo foi colhido ainda verde, considerando a variação no perfil de compostos de interesse em função do estágio de maturação. As amostras foram coletadas na zona urbana de Manaus, Amazonas, nas coordenadas -3,0809, -60,0169 para o urucum e -3,0804, -60,0170 para o jenipapo.

3.3 Métodos

3.3.1 Preparação das Amostras

Após a coleta, os frutos foram selecionados manualmente para remoção de partes deterioradas, lavados em água corrente e submetidos à secagem superficial com papel absorvente. Em seguida, foram acondicionados em freezer doméstico para conservação até o processamento.

Posteriormente, as amostras foram submetidas a pré-tratamento. Para o urucum, as sementes foram separadas manualmente do envoltório. O jenipapo verde foi triturado integralmente (casca, polpa e sementes) em equipamento Thermomix® TM6, até obtenção de material homogêneo.

As amostras processadas foram acondicionadas em sacos de polietileno e armazenadas a –18°C até a liofilização. O processo foi conduzido em liofilizador Enterprise I, operando entre –30 e –40°C, sob vácuo de aproximadamente 400 µHg, com o objetivo de preservar compostos bioativos sensíveis ao calor.

Após a liofilização, o material foi moído em moedor elétrico até obtenção de pó, sendo posteriormente armazenado em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, para minimizar degradações oxidativas e fotossensíveis.

3.3.2 Preparação dos Solventes Eutéticos Naturais (NADES)

A preparação dos solventes eutéticos naturais profundos (NADES) foi realizada por meio de aquecimento e agitação, conforme descrito na literatura [7, 59, 64–67]. Inicialmente, os componentes foram pesados de acordo com as proporções molares previamente definidas e misturados.

As misturas foram submetidas a aquecimento a 80°C em banho metabólico Dubnoff (AG-BMD), sob agitação constante, até a formação de soluções homogêneas e visualmente límpidas. Após resfriamento à temperatura ambiente, os NADES foram transferidos para frascos de vidro hermeticamente fechados e armazenados até a utilização.

3.3.3 Extração dos Compostos Bioativos

3.3.3.1 Avaliação Preliminar

A extração dos compostos bioativos foi realizada utilizando solventes eutéticos naturais (NADES), com condições específicas para cada matriz vegetal.

Para *Bixa orellana L.* (urucum), visando a extração de carotenoides, foram utilizados 0,3 g de amostra para 10 mL de NADES. A extração foi conduzida a 70 °C por 40 minutos em banho metabólico Dubnoff (AG-BMD), sob agitação. Após o processo, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e centrifugadas a 4500 rpm por 10 minutos (Centrífuga Digital Refrigerada Multirotores 20000-NM-BI, Daiki), sendo o sobrenadante coletado e armazenado em frascos de vidro, sob refrigeração e ao abrigo da luz.

Para *Genipa americana L.* (jenipapo), visando a extração de compostos fenólicos, foram utilizados 0,5 g de amostra para 10 mL de NADES. A extração foi realizada a 50 °C por 40 minutos, sob as mesmas condições de agitação, seguida de resfriamento, centrifugação e armazenamento conforme descrito anteriormente.

Os procedimentos foram baseados em protocolos da literatura [63, 68–71], com adaptações nas condições de temperatura, razão sólido:solvente e tempo de extração, bem como na utilização de NADES como solvente.

3.3.4 Determinação de Compostos Bioativos e Ensaios Antioxidantes

A determinação dos compostos bioativos foi realizada por meio da quantificação de compostos fenólicos totais, carotenoides totais e da atividade antioxidante pelos ensaios DPPH e FRAP. As análises espectrofotométricas foram conduzidas em triplicata utilizando espectrofotômetro de microplacas (EPOCH2, Biotek).

Os ensaios antioxidantes empregados nesta etapa foram selecionados com o objetivo de realizar uma avaliação preliminar dos extratos, sendo posteriormente ampliados nas etapas de otimização e aplicação descritas nos capítulos subsequentes.

3.3.4.1 Teor de Fenólicos Totais (TPC)

> *O conteúdo total de compostos fenólicos é uma medida da concentração de compostos fenólicos em uma determinada amostra, que são metabólitos secundários em plantas conhecidas por suas propriedades antioxidantes [72].*

O teor de fenólicos totais foi determinado utilizando o reagente Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Krecisz [73], com adaptações. Para o preparo, foi utilizada uma solução de Folin-Ciocalteu, que atua como agente oxidante, e uma solução de bicarbonato de sódio, que fornece e mantem o meio alcalino - de forma a deixar a reatividade maior e a reação numa faixa ótima. Neste ensaio, os elementos -OH dos fenóis interagem com os íons oxidantes, sendo perceptível visualmente a mudança de coloração da reação entre o verde amarelado fluorescente para o verde azulado escuro.

Primeiramente, foram preparadas as soluções de Folin-Ciocalteu (5 mL de reagente em 50 mL de água destilada) e de $NaHCO_3$ (6 g de bicarbonato de sódio em 100 mL de água destilada). A análise conduziu-se em microplacas de 96 poços com a diluição de 20 µL da amostra em 150 µL da solução de Folin-Ciocalteu, mantida em repouso, sem incidência de luz, por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de bicarbonato de sódio e a mistura foi incubada por 90 minutos. A absorbância foi medida a 750 nm em leitor de microplacas. Os resultados são expressos em equivalentes de ácido gálico (GAE), com base em curva padrão de calibração previamente realizada utilizando a equação de regressão de linear (equação 3.1) e o coeficiente de determinação (equação 3.2).

$$\boldsymbol{y = 0{,}0029x + 0{,}2011} \tag{3.1}$$

$$\boldsymbol{R^2 = 0{,}9901} \tag{3.2}$$

3.3.4.2 Teor de Carotenoides Totais (TCC)

O teor de carotenoides totais (TCC) representa a quantidade total desses pigmentos presentes em uma amostra. Os carotenoides são compostos lipofílicos amplamente distribuídos na natureza, conhecidos por sua intensa coloração, que varia do amarelo ao vermelho, e por desempenharem funções essenciais, como a captação de luz para a fotossíntese e a proteção celular contra o estresse oxidativo [74].

A quantificação de carotenoides foi realizada com base no método descrito por De Souza [75], com modificações. As amostras foram misturadas com água destilada e hexano na proporção 1:5:6 (v/v/v) - nessa operação ocorre a separação de fases, de modo que o hexano atue como imã para moléculas apolares lipofílicas -, seguidas de agitação em vortex por 1 minuto. O sobrenadante foi coletado e a absorbância foi medida a 450 nm em leitor de microplacas. Os resultados são expressos em equivalentes de β-caroteno (µg/mg), com base em curva padrão de calibração previamente realizada utilizando a equação de regressão de linear (equação 3.3) e o coeficiente de determinação (equação 3.4).

$$\boldsymbol{y = 0{,}0015x + 0{,}0637} \tag{3.3}$$

$$\boldsymbol{R^2 = 0{,}9927} \tag{3.4}$$

3.3.4.3 Ensaio 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

O 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) é um radical livre orgânico estável amplamente utilizado na avaliação de atividades antioxidantes devido à sua cor roxa intensa e propriedades paramagnéticas. Esse composto funciona como um agente redox ativo, reagindo com antioxidantes através da aceitação de elétrons ou átomos de hidrogênio, o que reduz seu caráter radical e provoca uma mudança de coloração, do roxo para o amarelo, que pode ser medida quantitativamente. O ensaio DPPH, portanto, é uma técnica eficaz para medir a capacidade dos antioxidantes de neutralizar esse radical, resultando em uma diminuição na absorbância em um comprimento de onda específico, refletindo diretamente o poder antioxidante das amostras analisadas [76–79].

A capacidade antioxidante foi avaliada pelo método de sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), conforme descrito por Molyneux, Rufino, Silveira e Sacramento [80–83], com adaptações. Uma solução metanólica de DPPH (100 M) foi preparada, e 10 µL da amostra foram adicionados a 190 µL dessa solução. A mistura foi incubada em ambiente escuro por 30 minutos à temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 515 nm em leitor de microplacas. Os resultados são expressos em equivalentes de Trolox (µM Trolox/ml), com base em curva padrão de calibração previamente realizada utilizando a equação de regressão de linear (equação 3.5) e o coeficiente de determinação (equação 3.6).

$$\boldsymbol{y = -0{,}0004x + 0{,}7223} \tag{3.5}$$

$$\boldsymbol{R^2 = 0{,}9949} \tag{3.6}$$

3.3.4.4 Ensaio Capacidade Antioxidante por Redução Férrica (FRAP)

A capacidade antioxidante de redução férrica (FRAP) é um ensaio que mede a capacidade dos antioxidantes de reduzir os íons férricos (Fe^{3+}) em íons ferrosos (Fe^{2+}). No ensaio FRAP, um reagente de derivatização é preparado, normalmente em uma solução tampão, que reage com antioxidantes em uma amostra. A mudança de cor resultante, devido à formação de um complexo colorido, é medida espectrofotometricamente, fornecendo uma avaliação quantitativa da capacidade antioxidante total da amostra [84].

O poder antioxidante por redução férrica foi avaliado pelo método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), conforme Rufino, Dos Santos e Sacramento [47, 83, 85, 86].

O reagente FRAP foi preparado a partir de 25 mL de tampão acetato a 300 mM - que mantem a solução em pH ácido -, 2,5 mL de TPTZ (2,4,6-Tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) a 10 mM - que é o agente quelante (ligante), atuando como o indicador da reação e estabilizador da solução - e 2,5 mL de $FeCl_3$ a 20 mM - agindo como substrato que vai ser reduzido (radical livre). A absorbância máxima do ensaio encontra-se no ph ácido, sendo este o motivo para ocorrer o controle com a solução tampão. Na placa de 96 poços, 9 µL de cada amostra foram adicionados a 27 µL de água destilada e 270 µL do reagente FRAP. A leitura foi feita imediatamente a 595 nm em leitor de microplacas. Os resultados são expressos em equivalentes de sulfato ferroso (µM Fe(II)/ml), com base em curva padrão de calibração previamente realizada utilizando a equação de regressão de linear (equação 3.7) e o coeficiente de determinação (equação 3.8).

$$\boldsymbol{y = 0{,}0009x - 0{,}137} \tag{3.7}$$

$$\boldsymbol{R^2 = 0{,}997} \tag{3.8}$$

3.3.5 Caracterização dos Solventes

3.3.5.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica utilizada para caracterizar compostos com base em seus grupos funcionais, fornecendo informações estruturais detalhadas. Esse método envolve a passagem de luz infravermelha pela amostra, onde diferentes comprimentos de onda são seletivamente absorvidos, promovendo transições vibracionais nas ligações químicas presentes. O espectro resultante, que representa a intensidade da luz absorvida em função do comprimento de onda, atua como uma "impressão digital"química, permitindo a identificação precisa das moléculas [87].

A caracterização dos NADES foi realizada por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier acoplada ao módulo de reflexão total atenuada (FTIR-ATR), utilizando o espectrofotômetro Agilent Cary 630 FTIR com cristal de seleneto de zinco (ZnSe). As análises foram conduzidas na faixa espectral de 680 a 4000 cm^{-1}, com resolução adequada para a identificação dos principais grupos funcionais presentes nos sistemas mais promissores.

3.3.6 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software R (versão 4.4.3).

Inicialmente, foi aplicada análise de variância (ANOVA) para verificar a existência de diferenças significativas entre os tratamentos. Quando identificadas diferenças estatisticamente significativas, foi utilizado o teste de comparação múltipla LSD (Least Significant Difference), com ajuste de Bonferroni para controle do erro do tipo I associado a múltiplas comparações, considerando nível de significância de 5%.

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Para representação gráfica, foi utilizado o erro padrão da média, com o objetivo de evidenciar a precisão das estimativas.

3.4 Resultados e Discussão

Neste tópico, serão apresentados os resultados da fase preliminar, indicando o efeito de extração de carotenoides e compostos fenólicos de *Bixa orellana* e *Genipa americana* com solventes eutéticos naturais (NADES). Serão discutidas as influências das características físico-químicas desses NADES na recuperação desses compostos, destacando os sistemas com melhor desempenho para cada classe de bioativos.

3.4.1 Avaliação Preliminar

Para a avaliação preliminar, foram selecionados 8 (oito) sistemas extrativos evidenciados na figura 3.1, sendo eles 6 (cinco) NADES e 2 (dois) hidroalcoólicos, considerando as suas características físico-químicas e potencial de solubilização de compostos bioativos. As misturas eutéticas escolhidas foram timol:ácido lático (Thy:Lac), cloreto de colina:ácido lático (ChCl:Lac), cloreto de colina:glicerol (ChCl:Gly), glicerol:ácido lático (Gly:Lac), sorbitol:ácido lático (Sor:Lac) - todos esses na proporção 1:2 - e por último, cloreto de colina:sorbitol (ChCl:Sor) na proporção 4:1. Na escolha dos solventes convencionais, para servir como parâmetro de desempenho, foram preparados uma solução etanólica (EtOH 50%) (v/v) e uma solução metanólica (MeOH 80%) (v/v).

Os sistemas eutéticos selecionados para esta avaliação diferem entre si em composi-

ção e polaridade, o que determina sua aptidão para extrair diferentes classes de compostos bioativos. O sistema Thy:Lac (1:2) pertence à categoria dos NADES do tipo V, formado exclusivamente por moléculas neutras, em que o timol atua como aceptor e doador parcial de ligações de hidrogênio, conferindo ao sistema um caráter hidrofóbico derivado de sua estrutura terpênica aromática [88–90]. O ácido lático, por sua vez, funciona como doador forte de ligações de hidrogênio por meio de seus grupamentos hidroxílico e carboxílico, e sua acidez moderada pode favorecer a solubilização de compostos fenólicos em meios levemente ácidos [65, 91]. A combinação desses dois componentes resulta em um sistema anfifílico com regiões hidrofóbicas capazes de interagir com compostos lipofílicos, como carotenoides [66, 68].

Os sistemas baseados em cloreto de colina (ChCl:Lac, ChCl:Gly e ChCl:Sor) são classificados como tipo III. O ChCl atua como aceptor de ligações de hidrogênio por meio de sua estrutura iônica e do grupo hidroxila presente, formando misturas eutéticas estáveis com doadores de múltiplos grupos –OH, como glicerol, sorbitol e ácido lático [59, 67, 92]. A elevada polaridade desses sistemas os torna adequados para a extração de compostos fenólicos e antocianinas, além de favorecer a estabilização de compostos hidrofílicos por interações eletrostáticas [70]. Os sistemas Gly:Lac e Sor:Lac, que não contêm componente iônico, dependem de interações HBD–HBD entre os poliálcoois e o ácido lático, resultando em polaridade moderada e viscosidade relativamente elevada — fatores que condicionam seu efeito extrativo, como discutido nas subseções seguintes. Os solventes convencionais EtOH 50% e MeOH 80% foram incluídos como referência de desempenho para os sistemas verdes avaliados [10].

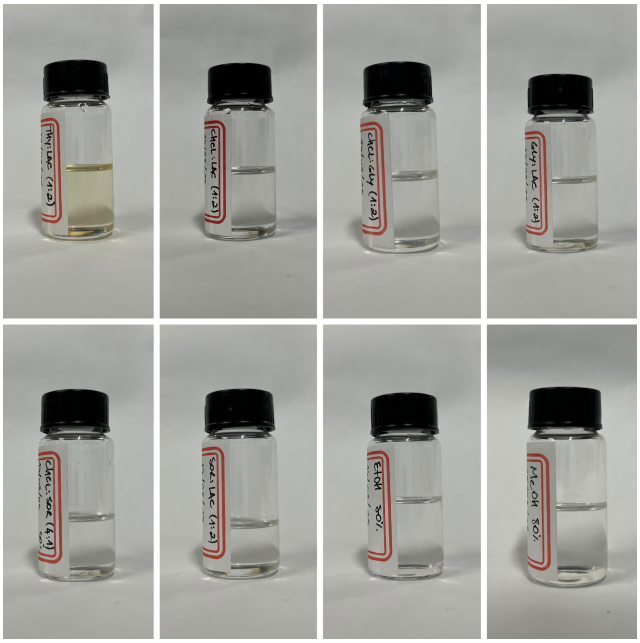


Figura 3.1 - Sistemas extrativos - Thy:Lac, ChCl:Lac, ChCl:Gly, Gly:Lac, ChCl:Sor, Sor:Lac, EtOH, MeOH.

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

3.4.1.1 Extração de Carotenoides Totais

Foram testados sete sistemas extrativos para a extração de carotenoides de *Bixa orellana*: Thy:Lac (1:2), Gly:Lac (1:2), ChCl:Lac (1:2), Sor:Lac (1:2), ChCl:Gly (1:2), MeOH 80% e EtOH 50%. Os valores reportados correspondem às leituras líquidas após subtração dos respectivos brancos (sistemas extrativos sem amostra vegetal). O melhor desempenho foi obtido com o sistema Thy:Lac (1:2), que alcançou 685,31 µg/mg, único sistema classificado com letra "a"pela análise de comparação múltipla (tabela 3.2), caracterizando superioridade estatística clara sobre todos os demais avaliados (figura 3.2). Esse resultado é coerente com o caráter hidrofóbico do sistema, o timol é um terpenoide fenólico com estrutura apolar que cria regiões de compatibilidade química com carotenoides lipofílicos, como a bixina e a norbixina, principais pigmentos das sementes de urucum [19,61]. O ácido lático, por sua vez, estabiliza a mistura por ligações de hidrogênio e contribui com a fluidez do sistema, favorecendo o contato com a matriz vegetal [66,68].



Figura 3.2 - Extratos de urucum.
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Os demais sistemas apresentaram desempenhos estatisticamente distintos entre si, configurando uma hierarquia de seis grupos (a–f) que reflete a influência da polaridade e da composição de cada solvente sobre a extração de compostos lipofílicos (figura 3.3). O Gly:Lac (1:2) posicionou-se como segundo (230,87 µg/mg, letra "b"), superando o MeOH 80% (217,53 µg/mg, letra "c") — resultado relevante porque se trata de um sistema sem componente iônico, formado exclusivamente pela interação entre dois HBDs. A posição intermediária do Gly:Lac pode ser atribuída ao caráter anfifílico do glicerol, cujos três grupos hidroxila permitem interações com regiões polares, enquanto a cadeia carbônica oferece alguma compatibilidade com compostos moderadamente apolares [93]. A acidez moderada do ácido lático pode também facilitar a ruptura de interações entre carotenoides e a matriz celular, auxiliando na liberação dos compostos durante a extração [65].

O MeOH 80% (letra "c") apresentou rendimento de 217,53 µg/mg, estatisticamente superior ao ChCl:Lac e aos demais NADES baseados em cloreto de colina. Esse desempenho é atribuído à menor fração aquosa da mistura metanólica (apenas 20% de água), que proporciona um ambiente mais adequado para a dissolução de compostos lipofílicos do que as formulações com alta densidade de grupos polares. O menor tamanho molecular do metanol também favorece a penetração celular e o acesso aos plastídeos onde os carotenoides são armazenados nas sementes [10]. O fato de o MeOH superar os sistemas

com ChCl é interessante, embora o cloreto de colina amplie a capacidade extrativa de compostos hidrofílicos, seu caráter fortemente iônico e hidrofílico parece desfavorecer a extração de compostos apolares como carotenoides.

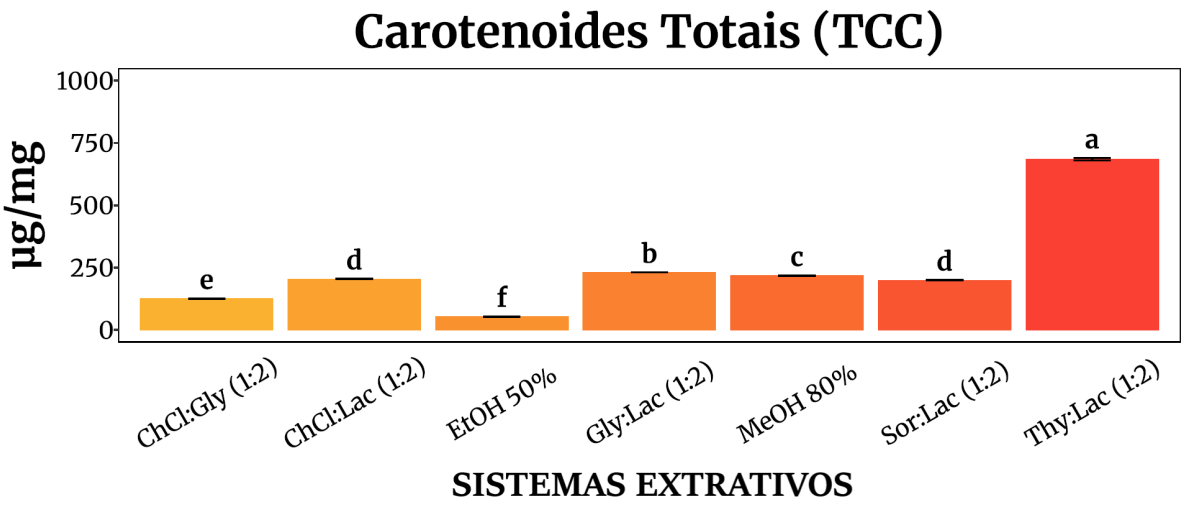


Figura 3.3 - Desempenho de diferentes sistemas extrativos aplicados à *Bixa orellana* em ensaio de TCC.
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Os sistemas ChCl:Lac (1:2) e Sor:Lac (1:2) compartilharam a letra "d"(204,20 e 199,53 µg/mg, respectivamente), sem diferença significativa entre si. Em ambos os casos, a presença do cloreto de colina como componente majoritário contribui para a elevada polaridade do sistema, limitando a compatibilidade com moléculas lipofílicas [59]. A semelhança de desempenho entre os dois sistemas, apesar da diferença de HBD (ácido lático vs. sorbitol), sugere que o fator determinante nesse nível de rendimento é a presença do cloreto de colina, não o doador de hidrogênio empregado. O sistema ChCl:Gly (1:2) apresentou o menor desempenho entre os NADES (125,53 µg/mg, letra "e"), a combinação do caráter iônico do ChCl com a alta hidrofilia do glicerol resulta em um sistema de polaridade elevada que oferece baixa compatibilidade com carotenoides [70]. O EtOH 50% obteve o menor rendimento geral (53,53 µg/mg, letra "f"), resultado coerente com sua alta fração aquosa (50% de água), que representa a principal barreira para a dissolução de compostos apolares.

Tabela 3.2 - Teor de carotenoides totais nos extratos de urucum.

Sistemas	**Concentração**	**Média (μg/mg) ± SD**
Thy:Lac	1:2	685,31 ± 8,33^a
Gly:Lac	1:2	230,87 ± 0,00^b
MeOH	80%	217,53 ± 0,66^c
ChCl:Lac	1:2	204,20 ± 0,67^d
Sor:Lac	1:2	199,53 ± 0,66^d
ChCl:Gly	1:2	125,53 ± 0,66^e
EtOH	50%	53,53 ± 0,66^f

Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão. Diferenças significativas entre os tratamentos foram determinadas por ANOVA, seguida do teste LSD (Least Significant Difference) com ajuste de Bonferroni ($p < 0,05$). Médias seguidas por letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

Os resultados obtidos são consistentes com a literatura para sistemas hidrofóbicos. Reportou-se que o NADES ChCl:Gly (1:4) alcançou 303,62 µg/g em folhas frescas de palmeira (*Elaeis guineensis*), superando o MeOH 80% no mesmo estudo, o que converge com a tendência observada aqui de que NADES com maior proporção de componente poliol favorecem a extração de carotenoides [59]. A razão molar 1:4, com proporção de glicerol maior do que a utilizada neste trabalho (1:2), produz sistema de polaridade ligeiramente menor, o que pode explicar o melhor desempenho daquele NADES em relação ao ChCl:Gly 1:2 deste estudo.

Estudos com sistemas análogos ao Thy:Lac, à base de mentol, reportaram valores substancialmente inferiores: Tanriver obteve entre 3,08 e 13,43 µg/mg em espinafre com L-mentol:ácido acético [94], e Sportiello indicou boa eficiência do DL-mentol:ácido lático em cascas de abóbora [68]. A diferença de magnitude em relação ao resultado aqui obtido é atribuível, em grande parte, à natureza da matriz vegetal - sementes de *B. orellana* são ricas em bixina e norbixina, carotenoides de alta concentração nessa espécie, o que favorece rendimentos superiores independentemente do solvente [61]. Demonstrou-se ainda que a razão sólido/líquido (S/L) impacta significativamente a eficiência, com rendimento de até 342,13 µg/g com S/L de 1:20, sugerindo que a otimização de parâmetros operacionais pode ampliar o potencial dos sistemas avaliados em etapas subsequentes [15].

3.4.1.2 Extração de Compostos Fenólicos

Foram testados (figura 3.4) sete sistemas extrativos para a extração de compostos fenólicos do jenipapo (*Genipa americana*): ChCl:Lac (1:2), ChCl:Gly (1:2), ChCl:Sor (4:1), MeOH 80%, EtOH 50%, Sor:Lac (1:2) e Gly:Lac (1:2). Os valores reportados correspondem às leituras líquidas após subtração dos respectivos brancos. O melhor desempenho foi observado com o sistema ChCl:Lac (1:2), que alcançou 324,79 mg GAE/g. Essa combinação se destaca pela forte capacidade do ácido lático de formar ligações de hidrogênio com grupos funcionais de compostos fenólicos e pela contribuição do cloreto de colina, que, por seu caráter iônico, pode interagir eletrostaticamente com compostos polares, promovendo maior solubilização e estabilização desses bioativos em solução [70, 91].

Os sistemas Gly:Lac (1:2) e Sor:Lac (1:2) foram avaliados, mas produziram valores abaixo do limite de detecção do método, sendo registrados como não detectados (ND) na tabela 3.3. Esses resultados são consistentes com a ausência de componente iônico nesses sistemas, sem o cloreto de colina, a rede de interações disponível para estabilizar compostos fenólicos polares é limitada a ligações de hidrogênio HBD-HBD entre os poliálcoois e o ácido lático, o que pode ser insuficiente para mobilizar e reter os compostos de interesse do jenipapo em concentração detectável [7,59]. Esses dois sistemas foram excluídos do gráfico comparativo (figura 3.5) e do cálculo estatístico por não gerarem valores quantificáveis.



Figura 3.4 - Extratos de jenipapo.
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

O sistema ChCl:Gly (1:2) posicionou-se como o segundo mais eficiente, com 282,38 mg GAE/g (letra "b"). A presença do glicerol, com três grupos hidroxila, contribui para a formação de uma extensa rede de ligações de hidrogênio capaz de interagir com compostos fenólicos polares [95]. O rendimento ligeiramente inferior ao do ChCl:Lac pode ser atribuído à maior viscosidade do sistema ChCl:Gly, o que pode restringir a difusão dos compostos durante a extração.

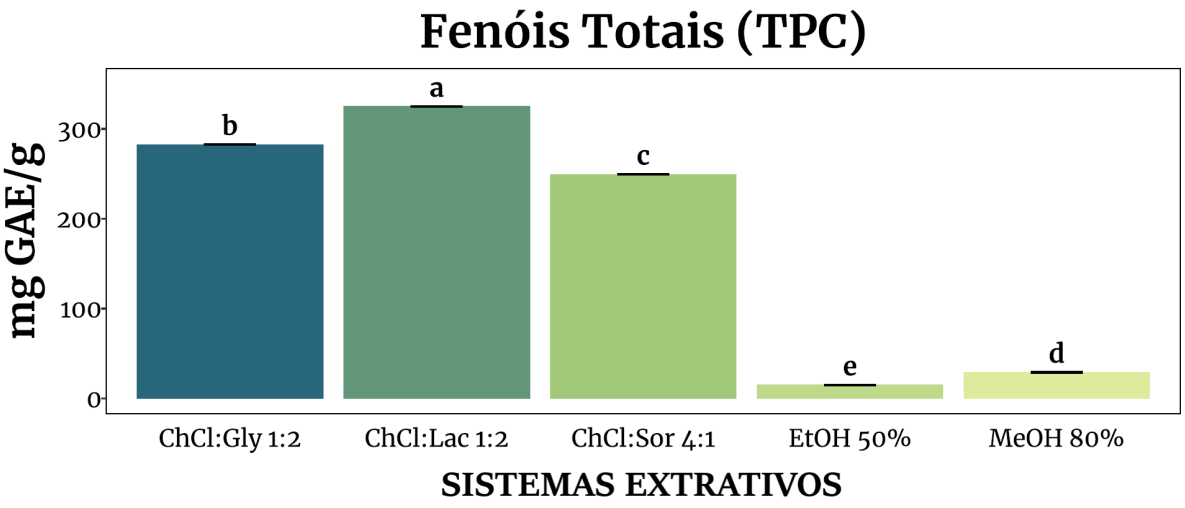


Figura 3.5 - Desempenho de diferentes sistemas extrativos aplicados à *Genipa americana* em ensaio de TPC.

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

O sistema ChCl:Sor (4:1) apresentou 249,28 mg GAE/g (letra "c"). A proporção 4:1 foi adotada porque, em razões molares equimolares ou com maior teor de sorbitol, a mistura não atingia consistência adequada para o manuseio nas etapas analíticas, comprometendo a reprodutibilidade. A maior proporção de cloreto de colina nessa formulação pode, em contrapartida, ter reduzido a capacidade de solvatação dos compostos fenólicos em relação aos sistemas com maior proporção de HBD, explicando seu posicionamento abaixo do ChCl:Gly.

Tabela 3.3 - Teor de fenólicos totais nos extratos de jenipapo.

Sistemas	**Concentração**	**Média (mg GAE/g) ± SD**
ChCl:Lac	1:2	$324{,}793 \pm 0{,}345^{a}$
ChCl:Gly	1:2	$282{,}379 \pm 0{,}345^{b}$
ChCl:Sor	4:1	$249{,}276 \pm 0{,}345^{c}$
MeOH	80%	$28{,}931 \pm 0{,}345^{d}$
EtOH	50%	$14{,}804 \pm 0{,}327^{e}$
Sor:Lac	1:2	ND
Gly:Lac	1:2	ND

Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão. Diferenças significativas entre os tratamentos foram determinadas por ANOVA, seguida do teste LSD (Least Significant Difference) com ajuste de Bonferroni ($p < 0{,}05$). Médias seguidas por letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos. ND: não detectado (valores negativos, abaixo do limite de detecção do método).

Entre os solventes convencionais (tabela 3.3), o MeOH 80% obteve 28,93 mg GAE/g e o EtOH 50% apresentou o menor valor detectável, com 14,80 mg GAE/g. A superioridade expressiva dos NADES baseados em ChCl em relação aos solventes convencionais é coerente com o caráter iônico e a elevada capacidade de formação de ligações de hidrogênio desses sistemas, características que favorecem a interação com a estrutura polar dos compostos fenólicos [70, 91].

O efeito dos NADES na extração de compostos fenólicos varia de acordo com a composição do sistema e a natureza do material vegetal. Observou-se que sistemas à base de colina, como ChCl:Lac e ChCl:Gly, se destacaram na extração de compostos fenólicos, apresentando rendimentos elevados, resultado que converge com os dados deste estudo [91]. Em contraste, foi reportado que o sistema ChCl:Sor (4:1) extraiu 16,59 mg/g de sementes de *Coffea canephora*, evidenciando o potencial desse sistema, embora os valores aqui obtidos para o jenipapo sejam consideravelmente superiores, refletindo as

diferenças no perfil fenólico das duas matrizes vegetais [96].

3.4.1.3 Ensaio de Atividade Antioxidante DPPH

No ensaio de DPPH, foram avaliados extratos de urucum (*Bixa orellana*) — com sete sistemas extrativos — e jenipapo (*Genipa americana*) — com sete sistemas. Todos os valores reportados correspondem às leituras líquidas após subtração dos respectivos brancos. Para o jenipapo, nenhum dos sete sistemas avaliados (ChCl:Lac, ChCl:Gly, ChCl:Sor, Gly:Lac, Sor:Lac, MeOH e EtOH) gerou atividade antioxidante detectável, sendo todos registrados como ND (tabela 3.4). Esse resultado é consistente com a composição fitoquímica do fruto verde, o jenipapo coletado em estágio imaturo apresenta perfil dominado por iridoides glicosilados — como genipossídeo e geniposídeo — e ácidos fenólicos conjugados, compostos com capacidade limitada de sequestro de radicais pelo mecanismo de transferência de átomo de hidrogênio (HAT), principal mecanismo envolvido no ensaio DPPH [22, 63]. Esse comportamento não implica ausência de atividade antioxidante na espécie, mas indica que os compostos predominantes no fruto verde não apresentam reatividade suficiente frente ao radical DPPH nas condições e concentrações utilizadas nesta triagem.

Para o urucum, três dos sete sistemas testados — MeOH 80%, EtOH 50% e Sor:Lac (1:2) — resultaram em valores não detectáveis (ND), enquanto quatro sistemas apresentaram atividade positiva e estatisticamente diferenciada (figura 3.6). O fato de o MeOH 80% e o Sor:Lac serem ND no DPPH, apesar de terem extraído teores relevantes de carotenoides no TCC (217,53 e 199,53 µg/mg, respectivamente), é coerente com a baixa reatividade dos carotenoides frente ao mecanismo HAT (Transferência de Átomo de Hidrogênio) - esses compostos atuam principalmente como antioxidantes por desativação de oxigênio singlete e transferência de elétrons [19, 61], mecanismos não captados pelo ensaio DPPH. Isso reforça que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante detectada nos sistemas positivos pertencem a outra classe química — provavelmente compostos fenólicos de baixo peso molecular extraídos preferencialmente pelos sistemas que contêm ChCl ou glicerol.

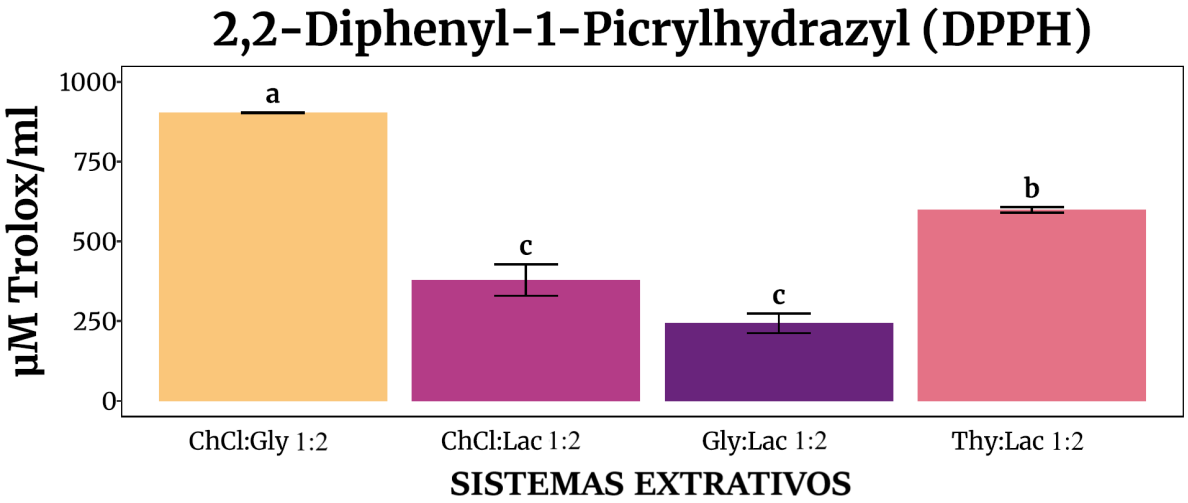


Figura 3.6 - Desempenho de diferentes sistemas extrativos aplicados à *Bixa orellana* em ensaio de DPPH.
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Entre os sistemas positivos para urucum, o ChCl:Gly (1:2) destacou-se com a maior capacidade antioxidante (903,25 ± 2,50 µM Trolox/mL, letra "a"), seguido pelo Thy:Lac (1:2) com 599,08 ± 15,07 µM Trolox/mL (letra "b"). Os sistemas ChCl:Lac (1:2) e Gly:Lac (1:2) não diferiram significativamente entre si (ambos com letra "c"), com médias de 379,08 e 243,25 µM Trolox/mL, respectivamente.

Tabela 3.4 - Efeito do potencial antioxidante dos extratos de urucum e jenipapo pelo método DPPH.

	Sistemas	Concentração	Média (μM Trolox/mL) ± SD
	ChCl:Gly	1:2	903,25 ± 2,50^a
	Thy:Lac	1:2	599,08 ± 15,07^b
	ChCl:Lac	1:2	379,08 ± 85,31^c
U	**Gly:Lac**	1:2	243,25 ± 52,92^c
	MeOH	80%	ND
	EtOH	50%	ND
	Sor:Lac	1:2	ND
	ChCl:Gly	1:2	ND
	ChCl:Lac	1:2	ND
	ChCl:Sor	4:1	ND
J	**Gly:Lac**	1:2	ND
	Sor:Lac	1:2	ND
	MeOH	80%	ND
	EtOH	50%	ND

Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão. Diferenças significativas entre os tratamentos foram determinadas por ANOVA, seguida do teste LSD (Least Significant Difference) com ajuste de Bonferroni ($p < 0,05$). Médias seguidas por letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos. J: jenipapo; U: urucum. ND: não detectado (valores negativos, abaixo do limite de detecção do método).

O desempenho do ChCl:Gly no DPPH pode ser atribuído à combinação da alta densidade de grupos hidroxila do glicerol, que favorecem a transferência de hidrogênio para o radical DPPH, e da maior compatibilidade do extrato polar com o meio metanólico do ensaio [91]. Esse bom desempenho no DPPH não se reflete no TCC, onde o ChCl:Gly apresentou o menor rendimento em carotenoides (125,53 µg/mg) entre os NADES. Essa dissociação confirma que são distintas as classes de compostos extraídas de forma preferencial por cada sistema - o ChCl:Gly, por sua elevada polaridade, favorece compostos fenólicos de baixo peso molecular com alta reatividade frente ao DPPH, enquanto o Thy:Lac, por seu caráter hidrofóbico, favorece os carotenoides.

O Thy:Lac (1:2), segundo melhor no DPPH, apresentou atividade antioxidante consistente entre as réplicas. Como o timol possui atividade antioxidante intrínseca pelo mecanismo HAT [97] e os resultados foram obtidos após subtração do branco, o valor reportado reflete exclusivamente a contribuição dos compostos transferidos da matriz vegetal. Essa atividade é compatível com a presença de compostos fenólicos nas sementes de *B. orellana* — como tocoferóis e ácidos fenólicos — que podem ser co-extraídos pelo

sistema hidrofóbico junto aos carotenoides [19].

3.4.1.4 Ensaio de Atividade Antioxidante FRAP

No ensaio de FRAP, foram avaliados extratos de urucum (*Bixa orellana*) e jenipapo (*Genipa americana*) evidenciados na figura 3.7 com diferentes combinações de NADES e solventes hidroalcoólicos, revelando variações significativas na capacidade antioxidante, de acordo com a tabela 3.5. Para o urucum, os sistemas Thy:Lac (1:2) e EtOH 50% apresentaram as maiores capacidades redutoras de ferro, com 2619,63 e 2481,85 µM Fe(II)/ml, respectivamente, sem diferença estatisticamente significativa entre eles (ambos com letra "a"). Esses dois sistemas superaram os demais NADES e o MeOH 80%, que apresentou o menor valor entre os sistemas avaliados para urucum (826,67 µM Fe(II)/ml).

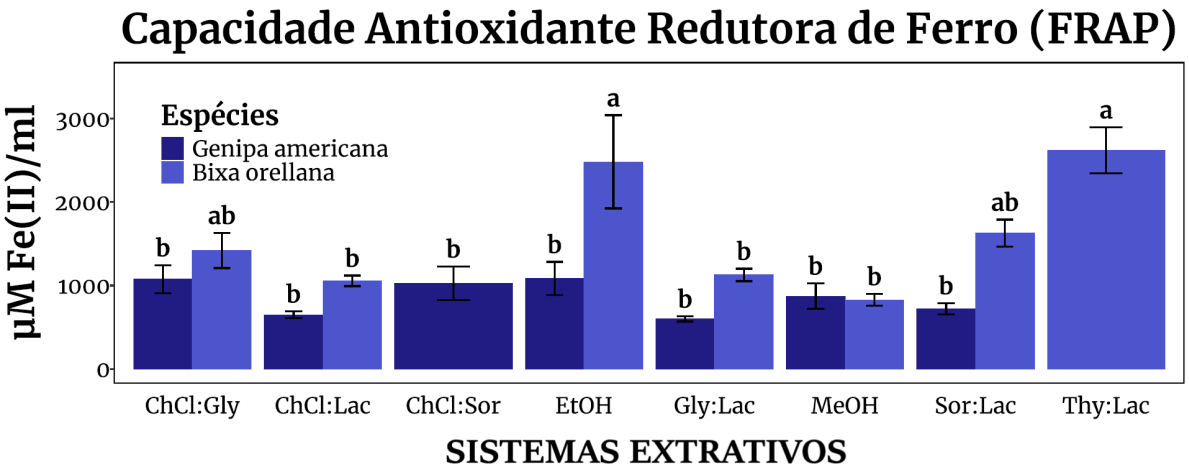


Figura 3.7 - Desempenho de diferentes sistemas extrativos aplicados à *Bixa orellana* e *Genipa americana* em ensaio de FRAP.

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Essa configuração merece atenção, o MeOH 80%, que foi o segundo sistema mais eficiente no TCC (217,53 µg/mg), apresentou o menor valor em FRAP — resultado aparentemente contraditório, dado que carotenoides contribuem para a redução de Fe^{3+} em Fe^{2+}. Uma explicação plausível é que o FRAP, sendo um ensaio de redução iônica conduzido em tampão ácido, é particularmente sensível a compostos fenólicos e ácidos orgânicos com potencial redutor [84]. Os sistemas NADES à base de ácido lático (Thy:Lac, Sor:Lac, Gly:Lac) contêm esse componente intrinsecamente redutor, cuja contribuição foi avaliada nos respectivos brancos e subtraída. Contudo, a diferença de matriz dos extratos — natureza lipofílica no Thy:Lac vs hidroalcoólica no MeOH — pode influenciar a taxa de

reação com o reagente FRAP e, consequentemente, o sinal obtido. A presença do timol, composto fenólico com potencial redutor documentado [97], também pode contribuir para o valor elevado do Thy:Lac, mesmo após subtração do branco, caso alguma fração do timol co-extraída da matriz não seja completamente separada pelo protocolo utilizado.

Tabela 3.5 - Efeito do potencial antioxidante dos extratos de urucum e jenipapo por redução férrica.

	Sistemas	Concentração	Média(μM Fe(II)/ml)) ± SD
	ChCl:Gly	1:2	1419,63 ± 365,00^{ab}
	ChCl:Lac	1:2	1055,56 ± 107,77^{b}
	EtOH	50%	2481,85 ± 967,22^{a}
U	**Gly:Lac**	1:2	1126,67 ± 128,89^{b}
	MeOH	80%	826,67 ± 123,33^{b}
	Sor:Lac	1:2	1626,67 ± 282,22^{ab}
	Thy:Lac	1:2	2619,63 ± 480,55^{a}
	ChCl:Gly	1:2	1074,44 ± 292,22^{b}
	ChCl:Lac	1:2	649,63 ± 69,44^{b}
	ChCl:Sor	4:1	1027,78 ± 347,78^{b}
J	**EtOH**	50%	1083,33 ± 345,55^{b}
	Gly:Lac	1:2	597,77 ± 54,44^{b}
	MeOH	80%	872,96 ± 262,78^{b}
	Sor:Lac	1:2	720,00 ± 118,89^{b}

Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão. Diferenças significativas entre os tratamentos foram determinadas por ANOVA, seguida do teste LSD (Least Significant Difference) com ajuste de Bonferroni ($p < 0,05$). Médias seguidas por letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos. U: urucum; J: jenipapo.

Para os extratos de jenipapo, nenhum dos sete sistemas testados se diferenciou estatisticamente dos demais no ensaio de FRAP (todos com letra "b", tabela 3.5), com valores variando de 597,77 µM Fe(II)/ml (Gly:Lac) a 1083,33 µM Fe(II)/ml (EtOH 50%). A ausência de diferenças significativas indica que os sistemas extrativos avaliados são equivalentes em sua capacidade de recuperar compostos redutores de ferro do jenipapo verde, e que nenhum NADES se distinguiu dos solventes convencionais neste ensaio. Esse resultado é consistente com a ausência de atividade detectável no DPPH para a mesma espécie, e reforça a hipótese de que o perfil fitoquímico do jenipapo verde — dominado por iridoides glicosilados com baixo potencial redutor — limita a expressão de atividade antioxidante nestes ensaios [62, 63]. A ausência de diferença entre NADES e solventes convencionais para o jenipapo também sugere que as vantagens estruturais dos sistemas eutéticos, observadas claramente para o urucum, dependem da composição da matriz

vegetal e da classe de compostos-alvo.

3.4.1.5 Análise Integrada dos Parâmetros de Extração e Atividade Antioxidante

A avaliação conjunta dos quatro parâmetros — TCC, TPC, DPPH e FRAP — revela que nenhum sistema extrativo apresentou desempenho superior de forma consistente em todos os critérios, o que reflete a dependência do efeito extrativo tanto da composição do solvente quanto da natureza físico-química dos compostos-alvo e dos mecanismos envolvidos em cada ensaio.

Para o urucum (*Bixa orellana*), o Thy:Lac (1:2) destacou-se claramente na extração de carotenoides (685,311 µg/mg; único sistema com letra "a"no TCC). Contudo, esse mesmo sistema não liderou o DPPH, onde o ChCl:Gly (1:2) apresentou o maior valor (903,25 µM Trolox/mL). Paralelamente, três sistemas que extraíram carotenoides com rendimento moderado a bom — MeOH 80%, EtOH 50% e Sor:Lac (1:2) — apresentaram ND no DPPH. Esse padrão de dissociação é conceitualmente coerente - carotenoides como a bixina atuam principalmente via desativação de oxigênio singlete e transferência de elétrons, mecanismos pouco captados pelo ensaio DPPH, que é sensível ao mecanismo HAT [19,61]. Os sistemas com atividade positiva no DPPH (ChCl:Gly, Thy:Lac, ChCl:Lac e Gly:Lac) são exatamente aqueles que, por polaridade ou caráter anfifílico, favorecem a co-extração de compostos fenólicos de baixo peso molecular junto aos pigmentos. No FRAP, Thy:Lac e EtOH 50% foram estatisticamente equivalentes (ambos com letra "a"), enquanto MeOH 80% apresentou o menor valor apesar de seu bom desempenho no TCC, o que sugere que o sinal FRAP dos NADES à base de ácido lático pode ser parcialmente influenciado pela natureza redutora dos próprios componentes do solvente [84].

Para o jenipapo (*Genipa americana*), a hierarquia de extração de fenólicos foi clara no TPC (ChCl:Lac > ChCl:Gly > ChCl:Sor >> MeOH > EtOH), mas não gerou atividade antioxidante detectável em nenhum dos sete sistemas avaliados no DPPH, nem diferenciação estatisticamente significativa no FRAP. Esse desacoplamento aponta para a composição fitoquímica do fruto verde - iridoides glicosilados e ácidos fenólicos conjugados são eficientemente extraídos pelos sistemas com ChCl, mas apresentam reatividade limitada frente aos mecanismos avaliados por DPPH e FRAP [22, 62, 63]. Os valores expressivos de TPC indicam que os NADES baseados em ChCl são eficientes na mobilização

de compostos polares da matriz, o que pode ter relevância em aplicações onde a extração seletiva é o critério principal.

Em conjunto, esses resultados orientam a seleção dos sistemas mais promissores - o Thy:Lac (1:2) para a recuperação de carotenoides do urucum, e o ChCl:Lac (1:2) para compostos fenólicos do jenipapo. A superioridade geral dos NADES sobre os solventes convencionais — especialmente para o urucum — reforça o potencial desses sistemas como alternativas sustentáveis de extração para matrizes amazônicas.

3.4.2 Seleção dos NADES Mais Promissores

Com base nos resultados da avaliação preliminar de extração de compostos bioativos, foram selecionadas duas combinações de NADES para a caracterização posterior. O sistema Thy:Lac (1:2) foi escolhido como principal para a extração de carotenoides do urucum (*Bixa orellana*), devido ao seu desempenho superior, alcançando 685,311 µg/mg, o maior valor entre todos os sistemas testados. Esse resultado destaca a afinidade desse sistema com compostos hidrofóbicos, como os carotenoides, beneficiando-se das características apolares do timol e da interação eficaz do ácido lático com as moléculas alvo.

Além disso, o sistema ChCl:Lac (1:2) foi selecionado como principal para a extração de compostos fenólicos, dado seu desempenho consistente para compostos fenólicos em jenipapo (*Genipa americana*), com 324,793 mg GAE/g. Essa versatilidade é atribuída à combinação equilibrada de cloreto de colina, que estabiliza compostos polares, e ácido lático, que facilita a formação de ligações de hidrogênio.

3.4.3 Análise Espectroscópica (FTIR)

A caracterização dos sistemas Thy:Lac (1:2) e ChCl:Lac (1:2) por FTIR-ATR teve como objetivo identificar alterações nos grupos funcionais dos componentes puros que sejam coerentes com o estabelecimento de interações intermoleculares nas misturas binárias. A técnica não confirma a formação de um sistema eutético em sentido termodinâmico estrito — tarefa que exigiria calorimetria diferencial de varredura e ressonância magnética nuclear —, mas fornece evidências funcionais da reorganização intermolecular por meio do monitoramento de deslocamentos de bandas características.

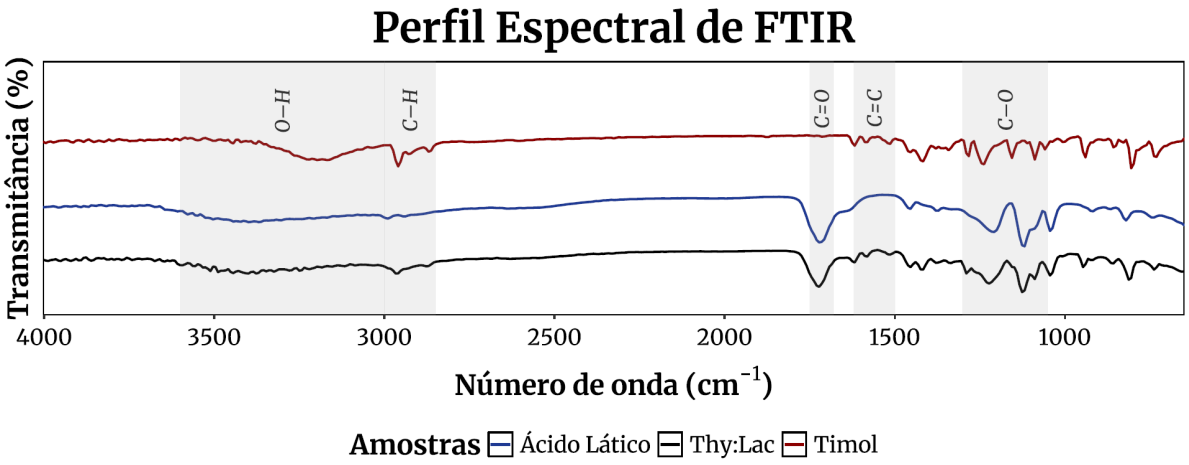


Figura 3.8 - Perfis espectrais de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) de timol, ácido lático e do sistema Thy:Lac (1:2).

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Para o sistema Thy:Lac (1:2) (figura 3.8 e tabela 3.6), a região O–H apresentou o deslocamento mais expressivo, a banda foi detectada em 3304,07 cm^{-1} no sistema binário, representando um deslocamento de aproximadamente 76 cm^{-1} para frequências menores em relação ao ácido lático puro (3379,98 cm^{-1}), cuja absorção O–H coincide praticamente com a do timol (3380,71 cm^{-1}). Deslocamentos nessa direção indicam enfraquecimento da ligação O–H intramolecular pelo estabelecimento de ligações de hidrogênio intermoleculares, coerente com a natureza dos dois componentes - o timol possui grupo fenólico doador de hidrogênio, enquanto o ácido lático dispõe de grupamentos carboxílico e hidroxílico, funcionando simultaneamente como doador e aceptor. Esse padrão é consistente com o descrito para sistemas hidrofóbicos baseados em timol, nos quais Maduka [98] e Martins [99] reportam deslocamentos análogos na banda O–H atribuídos à formação de rede de ligações de hidrogênio entre o grupo fenólico do timol e os sítios aceptores do componente parceiro.

Tabela 3.6 - Posições das bandas de absorção no infravermelho (cm^{-1}) e deslocamentos espectrais dos componentes puros e do sistema Thy:Lac (1:2).

Região	Ácido lático	Timol	Thy:Lac (1:2)	Δ (cm^{-1})
O–H	3379,98	3380,71	3304,07	$-75{,}91^{a}$
C–H	3034,05	3071,33	2996,78	$-74{,}55^{b}$
C=O	1662,39	ND	1669,85	$+7{,}45^{a}$
C=C	ND	1550,57	1550,57	$0{,}00^{b}$
C–O	1162,93	1334,39	1021,29	ND^{c}

^{a} Δ calculado em relação ao ácido lático puro. ^{b} Δ calculado em relação ao timol puro. ^{c} Bandas C–O de origens vibracionais distintas nos dois componentes (estiramento C–O fenólico no timol; C–O alifático associado aos grupamentos carboxílico e hidroxílico no ácido lático); deslocamento não interpretado como marcador de interação específica. ND: não detectado, componente sem absorção característica nessa região.

Não foram identificados estudos com caracterização FTIR específica do par timol:ácido lático, o que confere caráter original à presente análise. A banda C=O, identificada em 1662,39 cm^{-1} no ácido lático puro, deslocou-se apenas 7,45 cm^{-1} no sistema binário (1669,85 cm^{-1}) — variação próxima à margem de resolução instrumental —, sugerindo que a participação do grupamento carbonílico nas interações é mais limitada do que a do O–H, possivelmente porque o timol não oferece sítios aceptores com afinidade comparável à do cloreto de colina [100, 101].

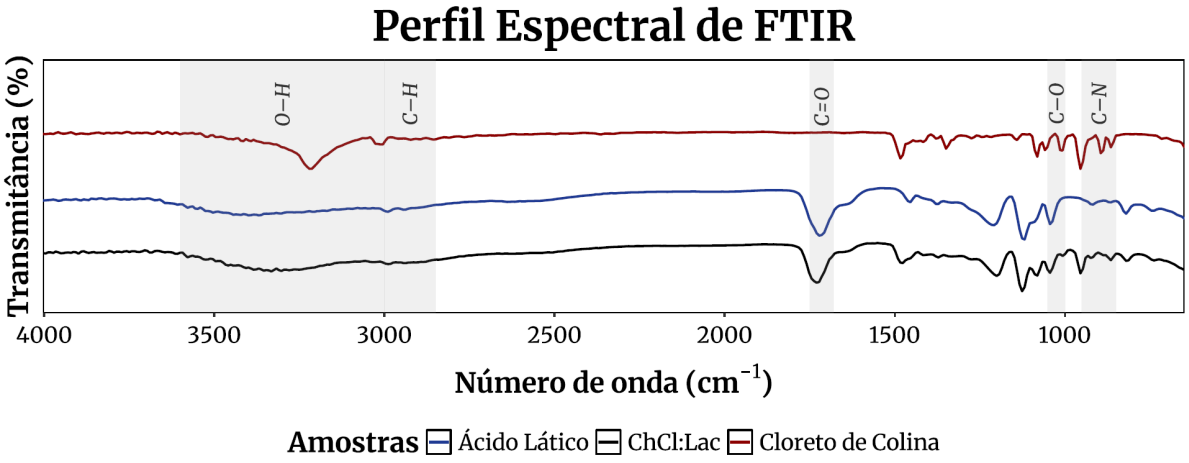


Figura 3.9 - Perfis espectrais de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) de cloreto de colina, ácido lático e do sistema ChCl:Lac (1:2).

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Para o sistema ChCl:Lac (1:2) (figura 3.9 e tabela 3.7), a banda O–H do sistema

binário foi detectada em 3304,68 cm^{-1}, resultando em deslocamento de 75,30 cm^{-1} em relação ao ácido lático puro (3379,98 cm^{-1}). Esse valor é próximo ao reportado por Fanali [101] para o mesmo sistema — aproximadamente 3301 cm^{-1} —, diferença de apenas 3,68 cm^{-1}, o que fortalece a interpretação de que o deslocamento reflete um padrão reprodutível de reorganização da rede de ligações de hidrogênio. A banda C=O deslocou-se de 1662,39 cm^{-1} no ácido lático puro para 1699,67 cm^{-1} no sistema binário (+37,27 cm^{-1}), sugerindo que o grupamento carbonílico, que no estado puro participava de interações com grupos O–H vizinhos, torna-se relativamente mais livre no sistema binário, pois os grupos O–H do ácido lático estabelecem interações preferenciais com os sítios do cloreto de colina [101]. A região C–N deslocou-se de 991,47 cm^{-1} no ChCl puro para 916,93 cm^{-1} no sistema binário (74,55 cm^{-1}), alteração coerente com mudanças no ambiente eletrostático ao redor do nitrogênio quaternário em sistemas iônicos misturados com doadores de hidrogênio [100, 102, 103].

Tabela 3.7 - Posições das bandas de absorção no infravermelho (cm^{-1}) e deslocamentos espectrais dos componentes puros e do sistema ChCl:Lac (1:2).

Região	**Ácido lático**	**ChCl**	**ChCl:Lac (1:2)**	**Δ (cm^{-1})**
O–H	3379,98	3356,01	3304,68	$-75{,}30^{a}$
C–H	3034,05	3034,05	2966,96	$-67{,}09^{a}$
C=O	1662,39	ND	1699,67	$+37{,}27^{a}$
C–N	ND	991,47	916,93	$-74{,}55^{b}$
C–O	1162,93	1162,93	1118,20	$-44{,}73^{a}$

[a] Δ calculado em relação ao ácido lático puro. Para C–H e C–O, ácido lático e ChCl apresentam absorções coincidentes. [b] Δ calculado em relação ao cloreto de colina puro, componente ao qual a banda C–N é atribuída exclusivamente. ND: não detectado, componente sem absorção característica nessa região.

Em ambos os sistemas, o deslocamento expressivo da banda O–H para menores frequências constitui o indicador mais robusto de reorganização intermolecular, sendo consistente com a formação de ligações de hidrogênio entre os componentes [99, 104]. Para o Thy:Lac, esse padrão — combinado com a estabilidade relativa do C=O — sugere que as interações ocorrem predominantemente pelo grupamento hidroxílico, conferindo ao sistema um caráter anfifílico funcionalmente compatível com a solubilização de compostos apolares como os carotenoides de *Bixa orellana*. Para o ChCl:Lac, a convergência entre os dados obtidos e os reportados na literatura [100, 101], aliada às alterações no C=O e no

C–N, constrói um padrão espectral internamente coerente com a formação de um sistema polar e hidrofílico, adequado à interação com compostos fenólicos de *Genipa americana*.

3.5 Conclusões

A avaliação preliminar conduzida neste capítulo demonstrou que o desempenho extrativo dos sistemas eutéticos naturais é determinado, de forma predominante, pela compatibilidade entre a polaridade do solvente e a classe de compostos-alvo. Para *Bixa orellana*, o sistema hidrofóbico Thy:Lac (1:2) superou todos os demais sistemas avaliados na extração de carotenoides, incluindo os solventes convencionais, o que é coerente com a afinidade estrutural entre o timol e compostos lipofílicos como bixina e norbixina. Para *Genipa americana*, os sistemas baseados em cloreto de colina extraíram compostos fenólicos em concentrações expressivamente superiores às obtidas com as soluções hidroalcoólicas, com o ChCl:Lac (1:2) apresentando o melhor desempenho — resultado atribuível à combinação de ligações de hidrogênio e interações iônicas que favorecem a solubilização de compostos polares.

Os ensaios antioxidantes reforçaram essa leitura e acrescentaram um dado relevante - a atividade detectada nos extratos de urucum não acompanhou proporcionalmente o rendimento em carotenoides, indicando que compostos de outras classes, co-extraídos de forma seletiva por determinados sistemas, são os principais responsáveis pela resposta nos ensaios DPPH e FRAP. Para o jenipapo verde, a ausência de atividade antioxidante detectável foi consistente em todos os sistemas e é atribuível ao perfil fitoquímico da espécie nesse estágio de maturação, não a limitações dos solventes. A caracterização por FTIR-ATR realça a existência de reorganização intermolecular nos dois sistemas selecionados, com padrões de deslocamento na região O–H coerentes com a formação de redes de ligações de hidrogênio e funcionalmente compatíveis com o comportamento extrativo observado.

Os resultados obtidos indicam que NADES formulados com componentes de origem natural são capazes de igualar ou superar solventes orgânicos convencionais na extração de bioativos de espécies amazônicas, com desempenho dependente da adequação entre composição do sistema e natureza dos compostos-alvo. Essa correspondência, demonstrada comparativamente para duas matrizes vegetais e duas classes distintas de compostos, contribui para o entendimento de como propriedades físico-químicas dos NADES condicionam

sua aplicabilidade extrativa — informação relevante para o desenvolvimento de protocolos de extração verde em matrizes da biodiversidade regional.

Capítulo 4

Aplicação da metodologia de superfície de resposta na otimização da extração de compostos bioativos com solventes eutéticos naturais

4.1 Introdução

O Capítulo 3 desta dissertação apresentou a seleção e a caracterização dos solventes eutéticos naturais Thy:Lac (timol:ácido láctico) e ChCl:Lac (cloreto de colina:ácido láctico) como candidatos adequados para a extração de compostos bioativos de matrizes amazônicas. Identificadas as formulações, a etapa seguinte consiste em determinar as condições operacionais que maximizam a eficiência do processo extrativo. A escolha do solvente, por si só, não garante resultados ótimos, variáveis como temperatura, tempo de extração e razão sólido-líquido interagem entre si e influenciam diretamente o rendimento dos compostos de interesse e a atividade antioxidante dos extratos [105, 106].

A otimização das condições de extração é, portanto, uma etapa essencial no desenvolvimento de processos extrativos baseados em NADES. Quando conduzida por experimentos univariados — variando um fator de cada vez enquanto os demais são mantidos fixos —, a análise tende a ignorar as interações entre as variáveis, o que pode levar a condições subótimas e conclusões imprecisas [105, 106]. A metodologia de superfície de resposta (RSM, do inglês Response Surface Methodology) apresenta-se como alternativa estatisticamente robusta, pois permite avaliar simultaneamente múltiplas variáveis e suas interações com um número reduzido de experimentos [107, 108].

Entre os designs experimentais associados à RSM, o Box–Behnken design (BBD)

tem sido adotado em estudos de otimização de extração com NADES. Trata-se de um design de segunda ordem com três níveis por fator, que não inclui os vértices do cubo fatorial, sendo eficiente quanto ao número de corridas experimentais e adequado quando os pontos extremos da faixa estudada são indesejáveis ou de difícil execução [107, 109]. Estudos recentes demonstraram que o BBD combinado à RSM modela com precisão a influência de variáveis como concentração de água no NADES, temperatura e tempo de extração sobre o rendimento de compostos fenólicos e a atividade antioxidante [110, 111].

As respostas analisadas neste capítulo compreendem o conteúdo de fenóis totais e carotenoides totais, e de forma complementar, a atividade antioxidante avaliada por três ensaios: DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). A combinação dessas métricas reflete a diversidade dos mecanismos antioxidantes nos extratos, enquanto DPPH e ABTS quantificam a capacidade de sequestro de radicais livres por transferência de elétron e de hidrogênio, o FRAP avalia a capacidade redutora total [112, 113]. A inclusão de carotenoides como variável resposta amplia o escopo analítico, dado o interesse crescente nesses pigmentos como bioativos com propriedades antioxidantes e potencial em aplicações alimentícias e cosméticas.

Além da otimização das condições de processo, este capítulo inclui a caracterização espectroscópica dos extratos otimizados por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Essa análise complementa os dados quantitativos ao identificar os grupos funcionais presentes nos extratos e evidenciar as interações moleculares estabelecidas entre os constituintes dos NADES e os compostos extraídos [114]. A estabilidade de pH dos NADES Thy:Lac e ChCl:Lac e a estabilidade de cor dos extratos otimizados também são avaliadas, pois essas propriedades condicionam tanto a viabilidade operacional dos solventes quanto a integridade dos bioativos ao longo do tempo. O pH influencia diretamente a ionização dos compostos fenólicos e a solubilidade de carotenoides, enquanto alterações de cor podem indicar degradação oxidativa ou polimerização dos compostos de interesse [114, 115].

Diante do exposto, este capítulo aplica o BBD associado à RSM para otimizar as condições de extração com os NADES Thy:Lac e ChCl:Lac a partir de matrizes amazônicas, tendo como respostas o conteúdo de fenóis totais, carotenoides e a atividade

antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP), além de caracterizar os extratos otimizados por FTIR e avaliar a estabilidade de pH dos solventes e de cor dos extratos.

4.2 Materiais

4.2.1 Reagentes Químicos

Os sistemas eutéticos naturais (NADES) estudados foram preparados por meio da mistura dos reagentes timol (⩾99.0% da Synth), cloreto de colina (⩾99.0% da Sigma-Aldrich), ácido lático (85.0 - 90.0% da Synth). As informações detalhadas sobre os reagentes são apresentadas na tabela 4.1. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, sendo empregados também nas determinações de compostos bioativos e avaliação da atividade antioxidante.

Tabela 4.1 - Descrição dos reagentes químicos escolhidos para os NADES.

Reagentes	**Peso Molar** ($\mathbf{g.mol^{-1}}$)	**Fabricante**	**Nº CAS**	**Pureza*** (%)
Ácido L-Lático	90,08	Synth	79-33-4	85.0 - 90.0
Cloreto de Colina	139,62	Sigma-Aldrich	67-48-1	⩾ 99.0
Timol	150,22	Synth	89-83-8	⩾ 99.0

*Todos os valores de pureza foram fornecidos pelos fabricantes.

4.2.2 Espécies Vegetais

As espécies vegetais utilizadas foram *Bixa orellana L.* (urucum) e *Genipa americana L.* (jenipapo), coletadas na zona urbana de Manaus, Amazonas, conforme descrito no Capítulo 3 (Seção 3.2.2). Para este estudo, foram considerados diferentes estágios de maturação, conforme previamente estabelecido.

4.3 Métodos

4.3.1 Preparação das Amostras

A preparação das amostras seguiu o procedimento descrito no Capítulo 3 (Seção 3.3.1), incluindo etapas de seleção, higienização, pré-tratamento e liofilização.

De forma resumida, as amostras de *Bixa orellana L.* foram submetidas à separação manual das sementes, enquanto *Genipa americana L.* foi triturada integralmente até obtenção de material homogêneo. Após liofilização, o material foi moído e armazenado ao abrigo da luz até utilização.

4.3.2 Preparação dos Solventes Eutéticos Naturais (NADES)

Os NADES foram preparados conforme metodologia descrita no Capítulo 3 (Seção 3.3.2), por meio de aquecimento e agitação dos componentes nas proporções molares estabelecidas.

De forma resumida, as misturas foram aquecidas a 80°C sob agitação até obtenção de soluções homogêneas, sendo posteriormente resfriadas e armazenadas até a utilização.

4.3.3 Planejamento Experimental Box-Behnken

O planejamento experimental Box-Behnken (BBD) é um tipo de design de superfície de resposta que permite explorar de forma eficiente os efeitos de múltiplas variáveis em uma variável de resposta com o mínimo de ensaios experimentais. Ele é caracterizado por sua simetria e rotatividade, o que proporciona estimativas precisas do erro experimental, tornando-se especialmente adequado para estudos que envolvem fatores numéricos e categóricos. Para ser aplicado, o Box-Behnken requer três níveis (1, 0, 1) e pode acomodar de 3 a 21 fatores, sendo calculado pela equação 4.1, onde N é o número total de experimentos, k é o número de fatores e C é o número de repetições nos pontos centrais, que aumentam a precisão do modelo [116].

$$\boldsymbol{N = 2k(k\text{-}1) + C} \tag{4.1}$$

Para o NADES ChCl:Lac, foi utilizado um planejamento experimental no formato Box-Behnken (BBD), composto por 17 combinações de condições experimentais, considerando três variáveis independentes (tabelas 4.2 e 4.3): proporção dos componentes do solvente (1:1, 1:2 e 2:1), tempo de extração (30, 45 e 60 minutos) e temperatura de extração (50, 60 e 70°C).

Para o NADES Thy:Lac, o mesmo formato de planejamento BBD foi adotado nas condições experimentais que resultaram em 17 combinações (tabelas 4.2 e 4.3). As variá-

Tabela 4.2 - Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento Box-Behnken (BBD) para otimização da extração com os NADES ChCl:Lac e Thy:Lac.

Variável Independente	Nível -1	Nível 0	Nível +1
ChCl:Lac			
Concentração (Proporção Molar)	1:1	1:2	2:1
Tempo (Minutos)	30	45	60
Temperatura (°C)	50	60	70
Thy:Lac			
Concentração (Proporção Molar)	1:1	1:2	2:1
Tempo (Minutos)	30	45	60
Temperatura (°C)	50	70	90

veis independentes foram: proporção dos componentes do solvente (1:1, 1:2 e 2:1), tempo de extração (30, 45 e 60 minutos) e temperatura de extração (50, 70 e 90°C). A faixa de temperatura mais elevada em relação ao ChCl:Lac reflete as diferenças nas propriedades físico-químicas do Thy:Lac, que requer condições mais enérgicas para promover a solubilização e a transferência de massa dos compostos bioativos.

Tabela 4.3 - Matriz do planejamento Box-Behnken (BBD) para otimização da extração com o NADES ChCl:Lac e Thy:Lac, com os valores das variáveis independentes decodificados.

Matriz BBD						
Ensaios	**ChCl:Lac**			**Thy:Lac**		
1	1:1	50°C	45 min	1:1	50°C	45 min
2	2:1	50°C	45 min	2:1	50°C	45 min
3	1:1	70°C	45 min	1:1	90°C	45 min
4	2:1	70°C	45 min	2:1	90°C	45 min
5	1:1	60°C	30 min	1:1	70°C	30 min
6	2:1	60°C	30 min	2:1	70°C	30 min
7	1:1	60°C	60 min	1:1	70°C	60 min
8	2:1	60°C	60 min	2:1	70°C	60 min
9	1:2	50°C	30 min	1:2	50°C	30 min
10	1:2	70°C	30 min	1:2	90°C	30 min
11	1:2	50°C	60 min	1:2	50°C	60 min
12	1:2	70°C	60 min	1:2	90°C	60 min
13	1:2	60°C	45 min	1:2	70°C	45 min
14	1:2	60°C	45 min	1:2	70°C	45 min
15	1:2	60°C	45 min	1:2	70°C	45 min
16	1:2	60°C	45 min	1:2	70°C	45 min
17	1:2	60°C	45 min	1:2	70°C	45 min

Para a extração de carotenoides, pesou-se 0,3 g da amostra de urucum para 10 mL de NADES. A extração foi em Banho Metabólico Dubnoff AG-BMD com sistema de agitação incorporado. Após o processo de aquecimento e agitação, a amostra foi resfriada à temperatura ambiente e submetida a uma etapa de centrifugação para separar o sobrenadante. A centrifugação foi conduzida na Centrífuga Digital Refrigerada Multirotores 20000-NM-BI Daiki a 4500 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos. Após a centrifugação, o extrato foi coletado, armazenado em frasco de vidro e mantido em recipiente fechado, sem incidência de luz, dentro da geladeira.

Para a extração de compostos fenólicos, pesou-se 0,5 g da amostra de jenipapo para 10 mL de NADES. A extração foi realizada também em banho agitador, seguida pelo mesmo processo de resfriamento e centrifugação descrito para a extração de carotenoides. O extrato foi coletado e armazenado sob as mesmas condições, protegido da luz, na geladeira.

O teor de carotenoides totais (TCC) e o teor de compostos fenólicos totais (TPC) foram selecionados como variáveis de resposta, e o experimento foi conduzido considerando três fatores e três níveis para obter resultados e otimizar o processo de extração. Essas combinações permitirão avaliar a influência isolada e combinada desses fatores sobre o rendimento dos bioativos. Os níveis selecionados para cada parâmetro foram definidos com base em estudos prévios [68, 71], ajustados para as características específicas das espécies amazônicas e dos NADES desenvolvidos.

A análise dos dados experimentais foi realizada por meio do ajuste de modelos polinomiais de segunda ordem (quadráticos), utilizando regressão múltipla, com avaliação da significância dos termos e da adequação do modelo por análise de variância (ANOVA), conforme o delineamento Box–Behnken empregado, com auxílio do Python.

4.3.4 Determinação de Compostos Bioativos e Ensaios Antioxidantes

A determinação dos compostos bioativos foi realizada por meio da quantificação de compostos fenólicos totais, carotenoides totais e da atividade antioxidante pelos ensaios DPPH, FRAP e ABTS, conforme metodologias descritas no Capítulo 3 (Seção 3.3.4).

As análises foram conduzidas em triplicata, utilizando espectrofotômetro de mi-

croplacas (EPOCH2, Biotek), sendo os resultados empregados como variáveis resposta no planejamento experimental do tipo Box-Behnken.

4.3.4.1 Teor de Fenólicos Totais (TPC)

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado conforme metodologia descrita no Capítulo 3 (Seção 3.3.4.1), sendo os resultados utilizados como variável resposta no planejamento experimental.

4.3.4.2 Teor de Carotenoides Totais (TCC)

O teor de carotenoides totais foi determinado conforme metodologia descrita no Capítulo 3 (Seção 3.3.4.2), sendo os resultados utilizados como variável resposta no planejamento experimental.

4.3.4.3 Ensaio 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

A atividade antioxidante pelo ensaio DPPH foi determinada conforme metodologia descrita no Capítulo 3 (Seção 3.3.4.3), sendo utilizada como resposta complementar na avaliação das condições de extração obtidas pelo planejamento experimental.

4.3.4.4 Ensaio Capacidade Antioxidante por Redução Férrica (FRAP)

A atividade antioxidante pelo ensaio FRAP foi determinada conforme metodologia descrita no Capítulo 3 (Seção 3.3.4.4), sendo utilizada como resposta complementar na avaliação das condições de extração obtidas pelo planejamento experimental.

4.3.4.5 Ensaio 2,2′-azino-bis(3-etilben zotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS)

> *O ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) é um composto utilizado para determinar a capacidade antioxidante total (TAC). Esse método baseia-se na geração do radical metaestável ABTS$^{\bullet+}$, que apresenta intensa coloração azul-esverdeada e pode ser eficientemente reduzido na presença de antioxidantes. Essa redução provoca uma diminuição mensurável na absorbância em um comprimento de onda específico, permitindo a quantificação precisa da atividade antioxidante das amostras analisadas [117].*

O método ABTS foi realizado segundo [47, 83, 118]. O radical ABTS$^{\bullet+}$ foi gerado pela reação entre solução de ABTS (7 mM) e persulfato de potássio (140 mM). Para a

formação do radical, 88 µL da solução de persulfato foram adicionados a 5 mL da solução de ABTS, mantendo-se a mistura em repouso por 16 horas ao abrigo da luz. Após esse período, a solução foi diluída em etanol até obtenção de absorbância de 0,70 ± 0,05 a 750 nm.

A análise foi conduzida em microplacas de 96 poços, utilizando 2 µL da amostra e 200 µL da solução de ABTS$\bullet^{+}$. Após incubação por 6 minutos ao abrigo da luz, a absorbância foi medida a 750 nm em leitor de microplacas. Os resultados são expressos em equivalentes de Trolox (µM Trolox/ml), com base em curva padrão de calibração previamente realizada utilizando a equação de regressão de linear (equação 4.2) e o coeficiente de determinação (equação 4.3).

$$\boldsymbol{y = -0{,}0003x + 0{,}7343} \tag{4.2}$$

$$\boldsymbol{R^2 = 0{,}9977} \tag{4.3}$$

4.3.5 Caracterização dos Extratos

4.3.5.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização dos extratos foi realizada por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier acoplada ao módulo de reflexão total atenuada (FTIR-ATR), conforme descrito no Capítulo 3 (Seção 3.3.5.1).

As análises foram conduzidas na faixa espectral de 680 a 4000 cm^{-1}.

4.3.6 Estabilidade dos Sistemas Extrativos e Extratos

4.3.6.1 pH

A avaliação do pH dos sistemas NADES foi conduzida, de forma adaptada [59], com o objetivo de monitorar sua estabilidade ao longo do tempo, sendo realizada em diferentes intervalos experimentais, compreendendo medições iniciais (0 dias) e ao longo do primeiro mês (7, 14, 21 e 28 dias), seguidas por avaliações em períodos mais longos até o quinto mês de armazenamento (60, 90, 120 e 150 dias). As análises foram efetuadas

à temperatura ambiente utilizando um pHmetro de bancada multiparâmetro da Mettler Toledo, previamente calibrado. Para cada determinação, o eletrodo foi completamente imerso na amostra, permanecendo em contato até a estabilização da leitura, momento em que o valor de pH foi registrado. Após cada medição, o eletrodo foi cuidadosamente lavado com água destilada e seco antes de sua reutilização em outras amostras. Todas as análises foram realizadas em triplicata, sendo os resultados expressos como média dos valores obtidos.

4.3.6.2 Colorimetria

A colorimetria é uma técnica utilizada para a quantificação objetiva da cor, baseada em sistemas padronizados como o espaço CIELab, que descreve a cor em três coordenadas: L (luminosidade), a* (variação entre vermelho e verde) e b* (variação entre amarelo e azul). Esse sistema permite a avaliação de diferenças de cor entre amostras de forma reprodutível, sendo amplamente aplicado no monitoramento de alterações visuais em sistemas alimentícios e extratos vegetais [119, 120].*

A caracterização da cor dos extratos otimizados foi realizada por meio das coordenadas L*, a* e b*, utilizando a escala CIELab, em espectrofotômetro DeltaVista 450G (DeltaColor). As análises foram conduzidas após a obtenção dos extratos e ao longo do armazenamento, em intervalos de 7 dias, durante 30 dias, com o objetivo de avaliar a estabilidade visual. A variação total de cor (ΔE) foi calculada a partir das diferenças entre os valores iniciais e aqueles obtidos ao longo do tempo, conforme Equação 4.4.

$$\boldsymbol{\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}} \tag{4.4}$$

4.4 Resultados e Discussão

Neste capítulo, são apresentados os resultados da otimização das condições de extração de compostos bioativos de *Bixa orellana* e *Genipa americana* com os NADES selecionados (Thy:Lac e ChCl:Lac), empregando o *Box–Behnken design* associado à metodologia de superfície de resposta (RSM). Serão discutidas as influências das variáveis de processo — temperatura, tempo de extração e concentração — sobre o rendimento de fenóis totais e carotenoides, definidos como respostas do modelo. Adicionalmente, a atividade antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP) será avaliada como resposta complementar, a

fim de verificar a manutenção da funcionalidade dos extratos após a otimização. Também serão abordadas a caracterização espectroscópica dos extratos otimizados por FTIR e a avaliação da estabilidade de pH dos solventes e de cor dos extratos.

4.4.1 Otimização da Extração por Metodologia de Superfície de Resposta

A seleção dos sistemas Thy:Lac para a extração de carotenoides de *Bixa orellana* e ChCl:Lac para a extração de compostos fenólicos de *Genipa americana*, realizada no capítulo anterior, fundamentou a definição dos pontos experimentais explorados nesta seção. As variáveis independentes avaliadas foram comuns a ambos os sistemas e são descritas ao longo desta seção de forma genérica como: X1 (proporção molar do NADES = 1:1, 1:2 e 2:1), X2 (temperatura de extração, em °C) e X3 (tempo de extração, em minutos).

Para o Thy:Lac, a faixa de X2 foi de 50 a 90°C; para o ChCl:Lac, de 50 a 70°C — diferença que reflete o caráter hidrofóbico do primeiro sistema, que requer condições energéticas mais elevadas para promover a solubilização de carotenoides apolares como bixina e norbixina, em contraste com a polaridade do ChCl:Lac, cujos compostos-alvo fenólicos são mobilizados sob condições menos enérgicas [68, 70]. A faixa de X3 foi de 30 a 60 minutos em ambos os sistemas. A variável de resposta foi o teor de carotenoides totais (TCC), expresso em equivalentes de β-caroteno (µg/mg), para o urucum, e o teor de compostos fenólicos totais (TPC), expresso em equivalentes de ácido gálico (mg GAE/g), para o jenipapo.

4.4.1.1 Ajuste e Validação dos Modelos

Carotenoides Totais — Bixa orellana / NADES Thy:Lac

O planejamento Box-Behnken foi composto por 17 ensaios para ambos os sistemas, com três fatores avaliados em três níveis e cinco repetições no ponto central, permitindo o ajuste de modelos polinomiais de segunda ordem. Para o TCC de *Bixa orellana*, o ponto central foi fixado em X1 = 1:2, X2 = 70°C e X3 = 45 min. O modelo apresentou R^2 = 0,9395 e R^2 ajustado de 0,8618, indicando que a maior parte da variação experimental foi explicada pela equação ajustada. A diferença moderada entre os dois coeficientes ($\Delta \approx 0{,}08$) é atribuível principalmente aos termos de interação, que não foram significa-

tivos e contribuem pouco para a resposta, sem comprometer a validade geral do modelo. O coeficiente de variação de 11,1% está dentro dos limites aceitáveis para processos de extração de compostos bioativos [116], confirmando precisão experimental adequada.

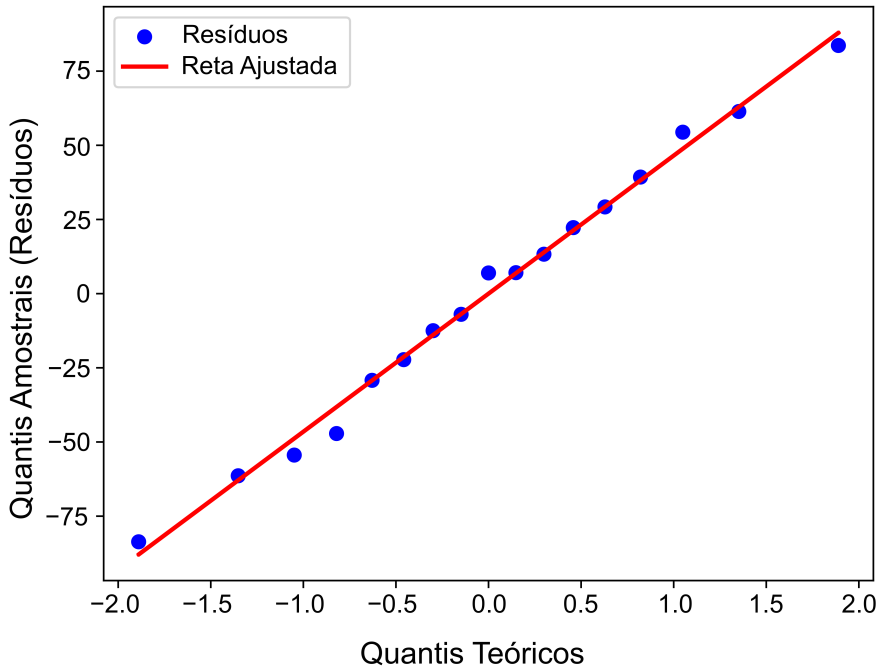


Figura 4.1 - Gráfico Q-Q plot dos resíduos do modelo quadrático ajustado para o teor de carotenoides totais (TCC) de *Bixa orellana* extraídos com o NADES Thy:Lac.

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

O diagnóstico dos resíduos pelo gráfico Q-Q plot (figura 4.1) mostrou distribuição dos pontos próxima à reta de referência, sem desvios sistemáticos ou *outliers* evidentes, indicando que o pressuposto de normalidade dos erros foi razoavelmente atendido e sustentando a validade dos testes de significância realizados na ANOVA.

A equação quadrática ajustada para o TCC, em função das variáveis reais empregadas no planejamento foi:

$$\begin{aligned}\hat{Y}_{\text{TCC}} = &-1196{,}53 - 245{,}92X_1 + 90{,}50X_2 + 36{,}40X_3 + 7{,}94X_1^2 \\ &- 0{,}658X_2^2 - 0{,}324X_3^2 + 0{,}034X_1X_2 - 0{,}121X_1X_3 - 0{,}079X_2X_3\end{aligned} \tag{4.5}$$

Compostos Fenólicos Totais — Genipa americana / NADES ChCl:Lac

Para o TPC da *Genipa americana*, o ponto central foi fixado em X1 = 1:2, X2 = 60°C e X3 = 45 min, condição adequada à faixa de temperatura do ChCl:Lac. O modelo quadrático ajustado apresentou $R^2 = 0{,}8746$ e R^2 ajustado de 0,7133. A diferença mais acentuada entre esses coeficientes ($\Delta \approx 0{,}16$) reflete que a resposta foi encaminhada predominantemente por dois termos - X1 e $X1^2$, enquanto os demais contribuíram de forma marginal. O coeficiente de variação foi de 7,8%, satisfatório para o sistema analisado. Os cinco pontos centrais apresentaram variabilidade muito reduzida (desvio padrão < 0,2 mg GAE/g), evidenciando alta reprodutibilidade do processo nessas condições.

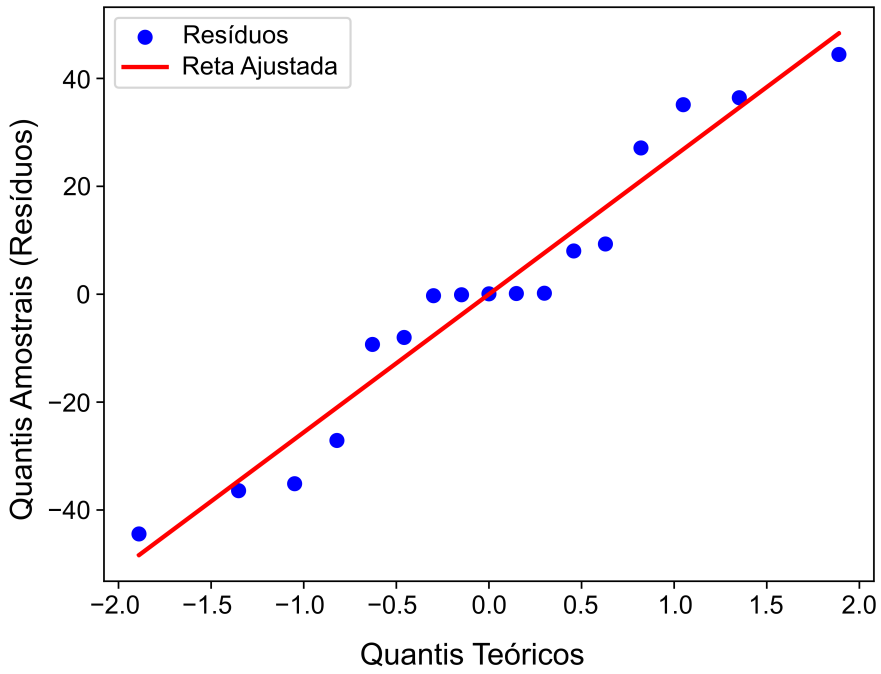


Figura 4.2 - Gráfico Q-Q plot dos resíduos do modelo quadrático ajustado para o teor de compostos fenólicos totais (TPC) de *Genipa americana* extraídos com o NADES ChCl:Lac.

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Apesar do ajuste menos robusto em comparação ao modelo para carotenoides, os resultados são adequados para identificar tendências e orientar a otimização dentro da área estudada. O Q-Q plot dos resíduos (figura 4.2) revelou distribuição geral próxima à linearidade, com desvios mais perceptíveis na cauda inferior - padrão atribuível ao forte contraste entre a variabilidade quase nula dos pontos centrais e a dos demais ensaios, que não compromete as conclusões principais do modelo.

A equação ajustada para o TPC foi:

$$\begin{aligned}\hat{Y}_{\text{TPC}} = &-1742{,}81 + 136{,}46X_1 + 42{,}73X_2 - 6{,}85X_3 - 3{,}641X_1^2 \\ &- 0{,}335X_2^2 + 0{,}066X_3^2 - 0{,}285X_1X_2 - 0{,}251X_1X_3 + 0{,}118X_2X_3\end{aligned} \tag{4.6}$$

4.4.1.2 Efeito das Variáveis sobre a Extração

Carotenoides Totais — Bixa orellana / NADES Thy:Lac

A análise de variância individual identificou quatro termos estatisticamente significativos ao nível de 5%: X2 ($p = 0{,}0004$), $X2^2$ ($p < 0{,}0001$), $X1^2$ ($p = 0{,}0007$) e X1 ($p = 0{,}0028$). Os termos X3 ($p = 0{,}0784$) e $X3^2$ ($p = 0{,}0701$) ficaram próximos ao limiar sem alcançá-lo, e nenhuma das interações binárias foi significativa ($p > 0{,}51$). O gráfico de Pareto (figura 4.3) confirma essa hierarquia: $X2^2$, X2, $X1^2$ e X1 ultrapassaram a linha de referência ($t_{\text{crit}} = 2{,}36$; $\alpha = 0{,}05$; df = 7), enquanto os demais termos permaneceram abaixo dela.

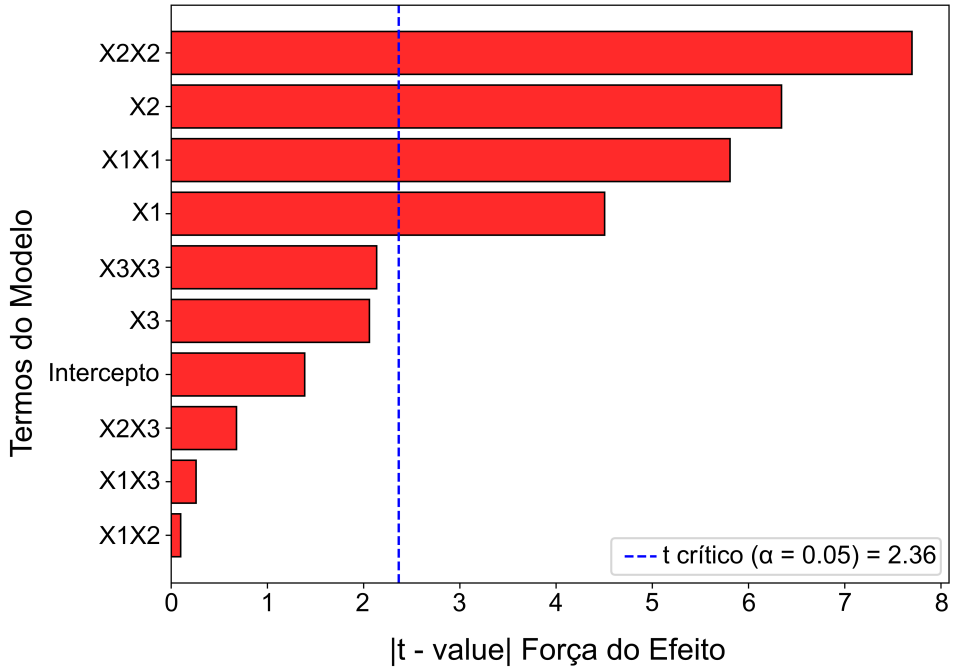


Figura 4.3 - Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados ($|t|$) para o teor de carotenoides totais (TCC) de *Bixa orellana* extraídos com o NADES Thy:Lac.

*A linha tracejada indica o valor crítico de t ($\alpha = 0{,}05$; df = 7; $t_{\text{crit}} = 2{,}36$).
Fonte: Elaborado pela autora (2026).

A co-dominância dos termos de X1 e X2 é consistente com o mecanismo de extra-

ção do Thy:Lac: a proporção molar (X1) determina o balanço anfifílico do solvente e sua compatibilidade com bixina e norbixina - compostos apolares que respondem à estrutura do meio mais do que às condições cinéticas - , enquanto a temperatura (X2) é o fator cinético determinante para sua mobilização a partir da matriz sólida de sementes de urucum [61, 68]. Esse padrão de co-dominância entre composição e temperatura é recorrente em estudos de otimização de carotenoides com DES hidrofóbicos, Sportiello e colaboradores identificaram comportamento análogo para pigmentos de subprodutos de abóbora com DES à base de mentol, com ambos os fatores atuando de forma independente e sem interação significativa [68]. Em sistema eutético hidrofóbico para licopeno de resíduo de tomate, destacaram-se que a hidrofobicidade controlada pela composição do solvente é o principal diferencial desses sistemas frente a compostos lipofílicos [121].

O coeficiente negativo de X1 ($b_1 = -245{,}92$) com quadrático positivo ($b_{11} = +7{,}94$) configura curvatura côncava para cima, com mínimo interno próximo à proporção 1:2 e resposta crescente em direção a 2:1. Esse comportamento é fisicamente coerente - nessa proporção, o balanço entre as regiões hidrofóbicas do timol e os sítios doadores do ácido lático resulta em menor compatibilidade com os pigmentos carotenoides, conforme indicado pelos deslocamentos da banda O-H observados no FTIR-ATR do sistema ($\Delta \approx -75{,}91\text{cm}^{-1}$) [98, 99]. Para X2, o coeficiente linear positivo ($b_2 = +90{,}50$) e quadrático negativo ($b_{22} = -0{,}658$) descrevem parábola côncava para baixo, com máximo analítico em torno de 68,8°C - próximo ao ponto ótimo previsto - , e a significância do par X2/X2^2 indica efeito não linear da temperatura, coerente com a termossensibilidade da bixina documentada na literatura [61, 68].

Compostos fenólicos totais — Genipa americana / NADES ChCl:Lac

Para o TPC, apenas X1 ($p = 0{,}007$) e X1^2 ($p = 0{,}002$) foram estatisticamente significativos ao nível de 5%. O gráfico de Pareto (figura 4.4) confirma essa dominância. X1^2 ($|t| \approx 4{,}75$) e X1 ($|t| \approx 3{,}77$) são os únicos termos acima de $t_{\text{crit}} = 2{,}36$ (df = 7; $\alpha = 0{,}05$), enquanto X2, X2^2, X3 e todas as interações ficaram abaixo de 2,0, confirmando que a composição do solvente foi o único fator determinante da resposta dentro do ponto estudado.

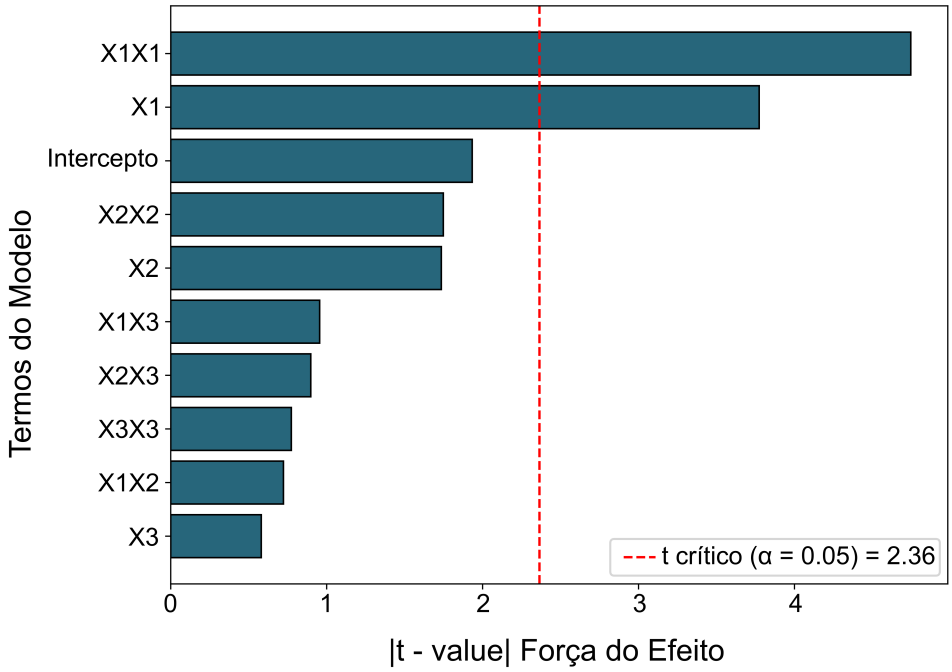


Figura 4.4 - Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados ($|t|$) para o teor de compostos fenólicos totais (TPC) de *Genipa americana* extraídos com o NADES ChCl:Lac. A linha tracejada indica o valor crítico de t ($\alpha = 0{,}05$; df $= 7$; $t_{\text{crit}} = 2{,}36$).

*A linha tracejada indica o valor crítico de t ($\alpha = 0{,}05$; df $= 7$; $t_{\text{crit}} = 2{,}36$).
Fonte: Elaborado pela autora (2026).

O coeficiente linear positivo de X1 ($b_1 = +136{,}46$) e quadrático negativo ($b_{11} = -3{,}641$) configuram parábola côncava para baixo, com máximo analítico univariado em X1 $\approx$ 18,7. A dominância de X1 e X1^2 é coerente com o papel central da proporção molar na capacidade extrativa do ChCl:Lac - a razão entre cloreto de colina e ácido lático determina a disponibilidade de sítios iônicos e de grupos doadores de ligações de hidrogênio - identificados como os principais mecanismos de solubilização de compostos fenólicos do jenipapo, conforme os deslocamentos C=O (+37,27 cm^{-1}) e C-N (−74,55 cm^{-1}) observados no FTIR-ATR do sistema ChCl:Lac [100, 101].

Esse padrão está em concordância com o reportado por Fanali e colaboradores para extração de compostos fenólicos de pele de avelã com o mesmo sistema ChCl:Lac, em que a proporção molar foi o fator de maior impacto, com temperatura e tempo exercendo contribuições secundárias [101]. Em otimização por RSM com NADES para fenólicos de *Pouteria lucuma*, observaram-se resultado convergente, sugerindo que a dominância da composição do solvente pode ser uma tendência geral em sistemas NADES hidrofílicos aplicados a matrizes ricas em compostos fenólicos polares [108]. Vale destacar que o

jenipapo verde não apresentou atividade antioxidante detectável por DPPH em nenhum dos sistemas avaliados na triagem preliminar, indicando que os compostos quantificados pelo TPC pertencem principalmente a classes de baixa reatividade frente ao radical DPPH - como iridoides glicosilados e compostos fenólicos conjugados - , sendo o TPC a variável de resposta mais adequada para representar o desempenho extrativo nesse sistema [62,63].

4.4.1.3 Superfícies de Resposta e Interações entre Variáveis

Carotenoides totais — Bixa orellana / NADES Thy:Lac

As superfícies de resposta para o TCC (figura 4.5) apresentaram comportamento curvilíneo nos eixos de X1 e X2, em concordância com os termos quadráticos significativos do modelo. De modo geral, a resposta foi maximizada quando X2 se aproximou de 65-70°C e X1 foi deslocado para o limite superior do ponto (2:1), com X3 em nível intermediário a alto, definindo uma região ótima bem delimitada. Essa temperatura ótima é próxima à condição de 70°C utilizada na triagem preliminar, mas as superfícies revelam que o ponto de máximo real situa-se ligeiramente abaixo - detalhe não identificável a partir de um experimento de condição única.

Na superfície X1 × X2 (figuras 4.5A e 4.5D), com X3 fixado em 45 min, a ausência de interação significativa ($p = 0{,}9245$) indica que os efeitos de X1 e X2 são independentes. A curvatura côncava para cima em X1 - com mínimo próximo à proporção 1:2 - combinada com a curvatura côncava para baixo em X2 resulta em pico bem definido no eixo de temperatura e resposta mais elevada no extremo superior do eixo de proporção. Na superfície X1 × X3 (figuras 4.5B e 4.5E), com X2 em 70°C, X3 exerceu influência positiva e gradual dentro da faixa estudada, sem declínio visível até 60 min - sugerindo que o limite experimental ainda não atingiu zona de equilíbrio cinético para os carotenoides nessas condições, o que é compatível com o tempo ótimo previsto (44 min) ser ligeiramente superior ao utilizado na triagem preliminar (40 min). Na superfície X2 × X3 (figuras 4.5C e 4.5F), com X1 em 1:2, a região de maior resposta concentrou-se em X2 ≈ 65-70°C e X3 ≈ 44-50 min, coerente com o ponto ótimo estimado. A estabilidade da resposta em torno de 60-75°C confere robustez operacional ao processo, pois pequenas variações de temperatura nessa faixa produzem resultados próximos ao máximo.

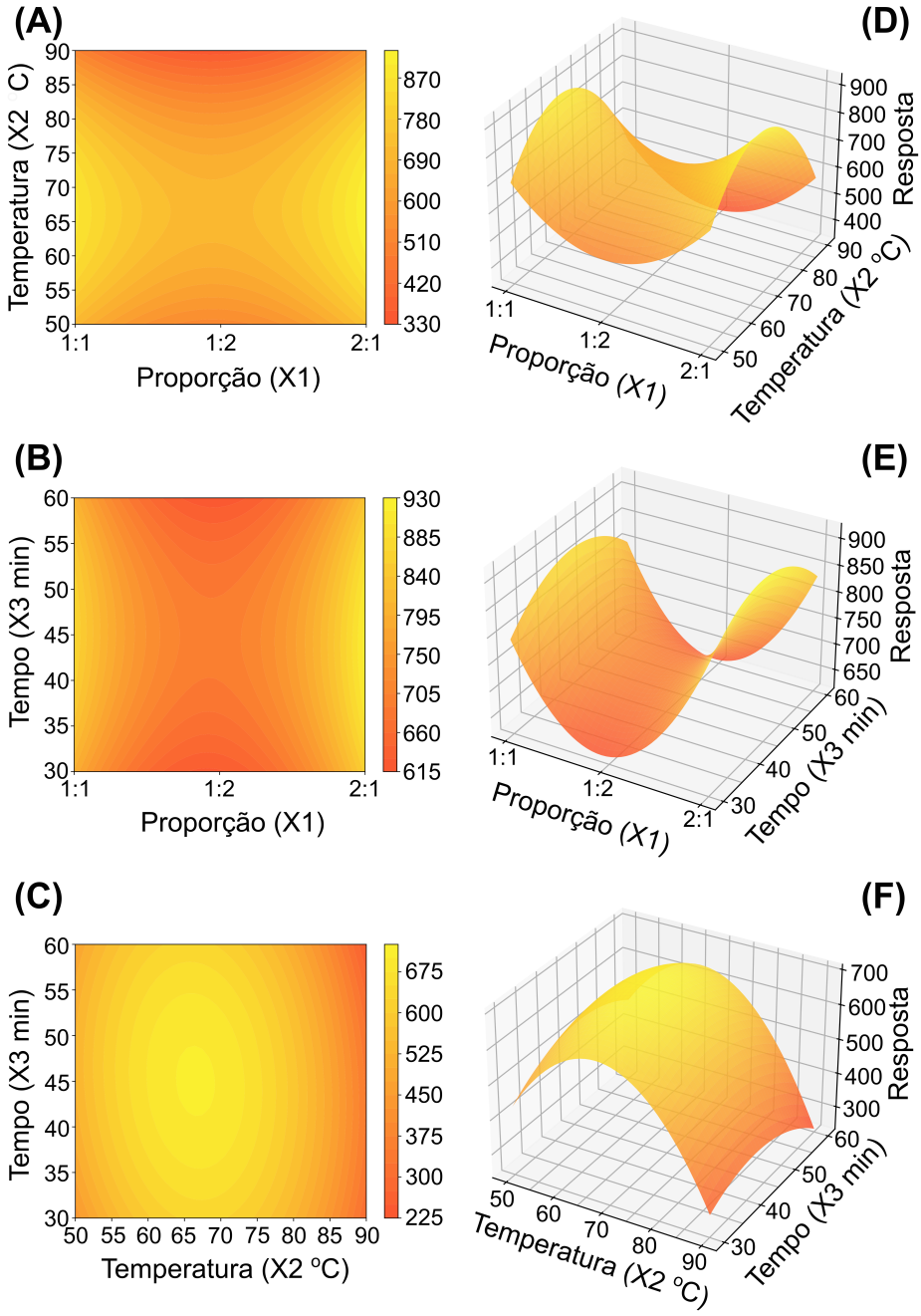


Figura 4.5 - Superfícies de resposta (D, E, F) e curvas de contorno (A, B, C) para o teor de carotenoides totais (TCC) de *Bixa orellana* extraídos com o NADES Thy:Lac.

(A, D) Proporção molar (X1) × Temperatura (X2), com X3 = 45 min; (B, E) Proporção molar (X1) × Tempo (X3), com X2 = 70°C; (C, F) Temperatura (X2) × Tempo (X3), com X1 = 1:2.
Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Compostos fenólicos totais — Genipa americana / NADES ChCl:Lac

Para o TPC (figura 4.6), as superfícies apresentaram morfologia de parábola côncava para baixo principalmente no eixo de X1, com variação mais suave ao longo de X2 e

X3, reflexo direto da dominância de X1 e $X1^2$ sobre a resposta. A região de maior TPC concentrou-se em proporções intermediárias a altas de X1, sem curvatura pronunciada nos eixos de temperatura e tempo.

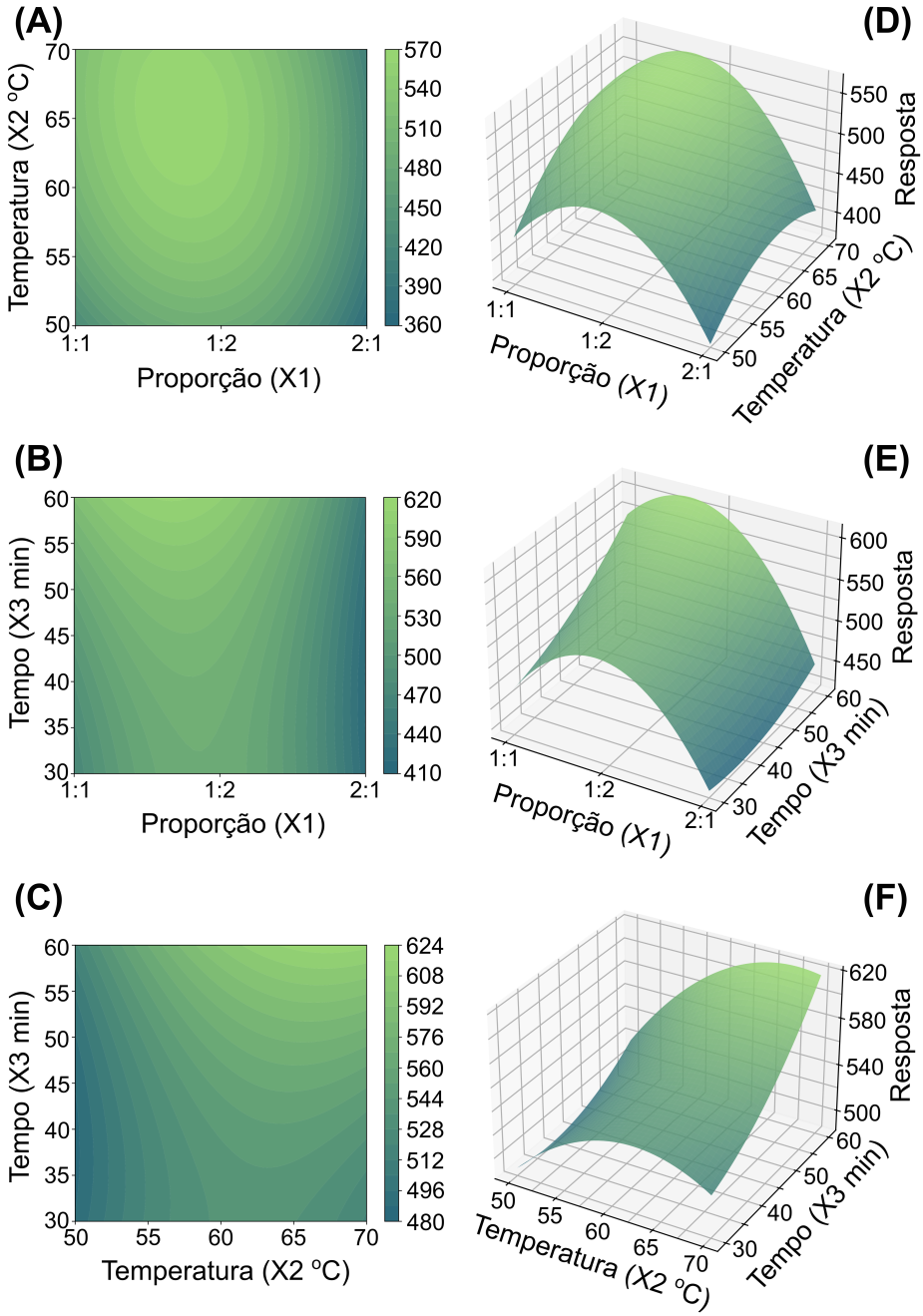


Figura 4.6 - Superfícies de resposta (D, E, F) e curvas de contorno (A, B, C) para o teor de compostos fenólicos totais (TPC) de *Genipa americana* extraídos com o NADES ChCl:Lac.

(A, D) Proporção molar (X1) × Temperatura (X2), com X3 = 45 min; (B, E) Proporção molar (X1) × Tempo (X3), com X2 = 60°C; (C, F) Temperatura (X2) × Tempo (X3), com X1 = 1:2.
Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Na superfície X1 × X2 (figuras 4.6A e 4.6D), a variação foi conduzida predominantemente por X1, com X2 exercendo influência de menor amplitude na faixa de 50-70°C e sem interação significativa ($p = 0{,}4932$). A temperatura nesse intervalo não modulou de forma mensurável a influência da proporção molar, resultado consistente com o caráter polar do ChCl:Lac, cujas interações com compostos fenólicos são mediadas por sítios iônicos e doadores de hidrogênio de forma relativamente independente da temperatura dentro da faixa moderada testada [70, 91].

A superfície X1 × X3 (figuras 4.6B e 4.6E) confirmou a dominância de X1, com X3 sem contribuição estatisticamente detectável ($p = 0{,}5797$) e sem interação significativa ($p = 0{,}3714$). O ótimo de X3 = 60 min no limite superior do ponto sugere que a extração pode continuar crescendo além dessa faixa, representando uma limitação a ser investigada em estudos futuros. A superfície X2 × X3 (figuras 4.6C e 4.6F) apresentou a menor amplitude de variação entre as três superfícies, reflexo da ausência de significância de X2, X3 e da interação entre eles ($p > 0{,}10$), confirmando que não há penalização perceptível no incremento dessas variáveis até seus limites superiores dentro do domínio estudado.

4.4.1.4 Condições Ótimas de Extração e Validação Experimental

Carotenoides totais — Bixa orellana / NADES Thy:Lac

A otimização do modelo indicou ponto ótimo em X1 = 2:1, X2 = 66,84°C e X3 = 44,21 min, com resposta prevista de 927,93 µg/mg. Os ótimos local e global apresentaram valores praticamente idênticos (diferença $< 0{,}02$ na resposta), reforçando a estabilidade matemática da solução. O ótimo de X1 coincide com o extremo superior do ponto (2:1), o que impede avaliar se proporções ainda maiores ampliariam o rendimento - limitação a ser considerada em estudos futuros. A validação experimental resultou em TCC = 877,98 µg/mg, com desvio de 5,4% em relação ao previsto, dentro da faixa de aceitabilidade para processos otimizados por RSM (< 10 %) [71, 116] e comparável aos desvios reportados em estudos recentes que combinaram NADES e RSM-BBD para carotenoides - tipicamente entre 2 e 8% [68, 121]. Em relação à condição utilizada na triagem preliminar (Thy:Lac 1:2, 70°C, 40 min; TCC = 685,31 µg/mg), a condição ótima representou melhoria de aproximadamente 28% no rendimento experimental, demonstrando o ganho concreto da etapa de otimização.

Compostos fenólicos totais — Genipa americana / NADES ChCl:Lac

Para o TPC, o ponto ótimo foi estimado em X1 ≈ 1:2 (entre as proporções 1:1 e 1:2), X2 = 67,89°C e X3 = 60 min, com resposta prevista de 634,39 mg GAE/g. A temperatura ótima (67,89°C) é consideravelmente superior à condição da triagem preliminar (50°C), indicando que esse fator foi subestimado naquela etapa e que a otimização foi essencial para revelar condições mais favoráveis ao sistema. A localização de X3 no limite superior do ponto é uma limitação relevante, pois impede afirmar que 60 min é o tempo ótimo real, recomendando investigação em faixas mais amplas. A validação experimental resultou em TPC = 672,38 mg GAE/g, com desvio de 6,0% acima da previsão - dentro da faixa aceitável [116] e confirmando a utilidade prática do modelo apesar de seu ajuste global moderado.

Para contexto, Fanali e colaboradores reportaram R^2 ajustado entre 0,87 e 0,93 para extração de fenólicos de avelã com ChCl:Lac em matriz de composição mais homogênea [101]; a maior diversidade fitoquímica do jenipapo verde - com múltiplas classes de compostos fenólicos conjugados e iridoides glicosilados - é consistente com o ajuste mais modesto obtido aqui, conforme padrão discutido por [122] em otimizações por BBD com NADES para matrizes de elevada complexidade química. Em comparação à triagem (ChCl:Lac 1:2, 50°C, 40 min; TPC = 324,79 mg GAE/g), o resultado validado representa aumento de aproximadamente 107%, evidenciando o impacto expressivo da otimização das condições operacionais.

4.4.1.5 Atividade Antioxidante dos Extratos Otimizados

A atividade antioxidante dos extratos obtidos nas condições ótimas foi avaliada por três métodos complementares - DPPH, ABTS e FRAP -, cujos resultados estão apresentados na tabela 4.4. O emprego de múltiplos métodos é recomendado para extratos de origem vegetal, dado que compostos de estruturas distintas respondem de forma diferenciada a cada mecanismo de ação antioxidante: transferência de átomo de hidrogênio (HAT), avaliada por DPPH e ABTS, e redução de metal, avaliada por FRAP [123, 124].

Tabela 4.4 - Atividade antioxidante dos extratos otimizados de *Bixa orellana* e *Genipa americana*.

Método	***B. orellana***	***G. americana***
DPPH (μM Trolox/mL)	$759{,}92 \pm 3{,}82$	$923{,}25 \pm 50{,}19$
ABTS (μM Trolox/mL)	$2207{,}67 \pm 37{,}86$	$1842{,}11 \pm 134{,}01$
FRAP (μM Fe(II)/mL)	$1335{,}93 \pm 7{,}80$	$1588{,}52 \pm 10{,}08$

Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão.

O extrato otimizado de urucum (Thy:Lac) apresentou DPPH de $759{,}92 \pm 3{,}82$ µM Trolox/mL, ABTS de $2207{,}67 \pm 37{,}86$ µM Trolox/mL e FRAP de $1335{,}93 \pm 7{,}80$ µM Fe(II)/mL. Os coeficientes de variação inferiores a 2% nos três métodos indicam alta reprodutibilidade analítica, coerente com a estabilidade dos carotenoides nas condições de armazenamento adotadas. O valor de DPPH representa aumento de 26,8% em relação ao extrato obtido na triagem preliminar (599,08 µM Trolox/mL), esperado dado o maior rendimento de TCC na condição otimizada.

A atividade pelo ABTS foi aproximadamente 2,9 vezes superior ao DPPH, diferença atribuível às distintas afinidades desses radicais com as estruturas moleculares de bixina e norbixina - o ABTS, que responde tanto a antioxidantes hidrofílicos quanto lipofílicos, captura com maior eficiência a contribuição de carotenoides em meio parcialmente polar [123,125]. A redução observada no FRAP em relação à triagem ($-49{,}0$ %), apesar do maior TCC, pode refletir que as condições otimizadas favoreceram seletivamente a extração de pigmentos carotenoides com menor potencial redutor de ferro, enquanto outras classes de compostos com alta capacidade redutora foram extraídas com menor eficiência relativa na proporção 2:1 do Thy:Lac [126].

O extrato otimizado de jenipapo (ChCl:Lac) apresentou DPPH de $923{,}25 \pm 50{,}19$ µM Trolox/mL, ABTS de $1842{,}11 \pm 134{,}01$ µM Trolox/mL e FRAP de $1588{,}52 \pm 10{,}08$ µM Fe(II)/mL. A detecção de atividade antioxidante por DPPH neste extrato é um resultado relevante - na triagem preliminar, todos os sistemas testados com jenipapo retornaram DPPH não detectável, condição atribuída à baixa concentração de compostos fenólicos livres nas condições não otimizadas (TPC = 324,79 mg GAE/g). O aumento de 107% no TPC promovido pela otimização elevou a concentração de fenólicos a um patamar suficiente para exercer atividade mensurável frente ao radical DPPH, ainda que com maior variabilidade entre replicatas (CV = 5,4%) em comparação aos métodos FRAP e ABTS.

O FRAP registrou aumento de 144,5% em relação à triagem 649,63 µM Fe(II)/mL) - o maior ganho relativo entre os três métodos -, consistente com a alta sensibilidade desse método a compostos fenólicos com grupos *o*-dihidroxila, como catecois e ácidos hidroxicinâmicos, presentes em maior concentração nos extratos otimizados [124, 127]. O ABTS apresentou valor superior ao DPPH (1842,11 vs 923,25 µM Trolox/mL), padrão observado em extratos ricos em iridoides e compostos fenólicos conjugados, que apresentam maior reatividade frente ao radical $ABTS^{\bullet+}$ do que ao DPPH [63, 125].

Em termos comparativos entre os dois sistemas, o urucum apresentou maior atividade pelo ABTS (2207,67 vs 1842,11 µM Trolox/mL), enquanto o jenipapo superou o urucum por DPPH (923,25 vs 759,92 µM Trolox/mL) e FRAP (1588,52 vs 1335,93 µM Fe(II)/mL), em todos os casos com razões próximas de 1,2. A diferença modesta em magnitude relativa reflete perfis antioxidantes qualitativamente distintos - o extrato de urucum é dominado por carotenoides apolares com alta reatividade frente ao ABTS, enquanto o extrato de jenipapo, de caráter hidrofílico, contém compostos fenólicos com maior diversidade de mecanismos antioxidantes, resultando em atividade superior nos métodos HAT (DPPH) e de redução de metal (FRAP) [123, 126]. Esses resultados demonstram que as condições otimizadas pela RSM não apenas maximizaram a quantidade de compostos extraídos, como também garantiram a preservação - e, no caso do jenipapo, a revelação - de sua capacidade antioxidante.

Em conjunto, os resultados desta seção demonstram que a metodologia de superfície de resposta com delineamento Box-Behnken foi uma abordagem eficaz para a otimização da extração de compostos bioativos com NADES a partir de espécies amazônicas, em concordância com estudos que adotaram estratégia similar para diferentes sistemas solvente-matriz [68, 101, 128]. Para a *Bixa orellana*, há evidência forte de que a proporção molar do Thy:Lac e a temperatura controlam a extração de carotenoides, com modelo globalmente significativo ($p < 0{,}001$), $R^2 = 0{,}94$ e ponto ótimo validado experimentalmente com desvio de 5,4%.

Para a *Genipa americana*, a proporção do ChCl:Lac foi o único fator individual determinante (X1 e $X1^2$; $p < 0{,}01$), com ponto ótimo validado com desvio de 6,0% e ganho de 107% em relação à triagem. As condições otimizadas - X1 = 2:1, X2 ≈ 67°C e X3 ≈ 44 min para o Thy:Lac, e X1 ≈ 1:2, X2 ≈ 68°C e X3 = 60 min para o ChCl:Lac

- constituem a base operacional para as seções seguintes, que abordam a caracterização por FTIR dos sistemas eutéticos e dos extratos otimizados, bem como a avaliação dos parâmetros físico-químicos e de cor.

4.4.2 Caracterização dos Extratos Otimizados por FTIR

Bixa orellana apresenta um perfil de bioativos predominantemente lipofílico, com destaque para a bixina — um apocarotenoide com extensa cadeia poliene conjugada, grupo éster metílico e caráter apolar — cujos grupos funcionais característicos produzem absorções definidas no infravermelho. A comparação entre os espectros da matriz vegetal, do extrato otimizado e do solvente eutético Thy:Lac 2:1 (figura 4.7), obtidos por FTIR-ATR na faixa de 680 a 4000 cm^{-1}, permite avaliar em que medida o processo extrativo alterou o perfil funcional da amostra.

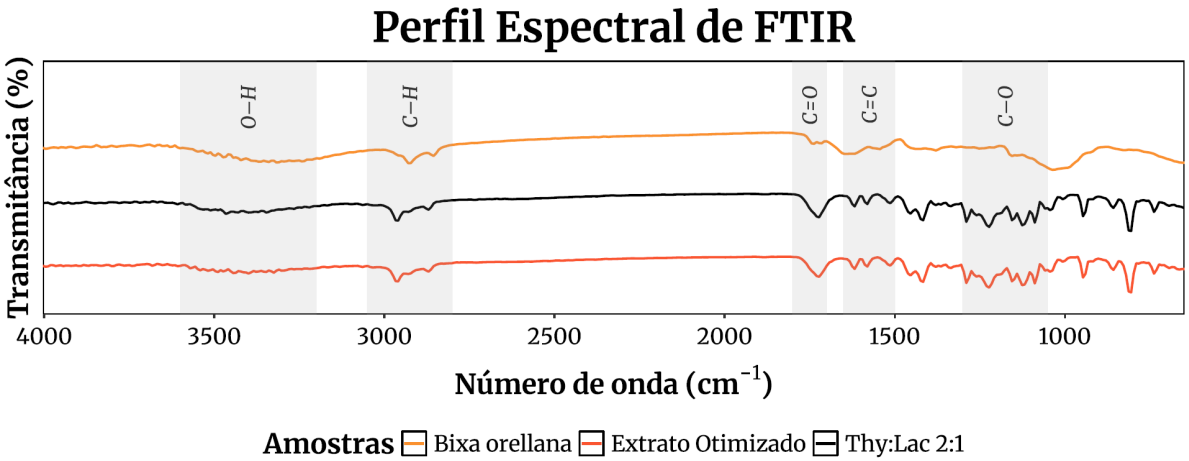


Figura 4.7 - Perfis espectrais de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) de *Bixa orellana*, do sistema Thy:Lac (2:1) e do extrato otimizado.

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

A região O–H exibiu deslocamento positivo de aproximadamente +39 cm^{-1} no extrato em relação à matriz, indicando mudança na rede de pontes de hidrogênio decorrente da remoção de componentes estruturais polares, como polissacarídeos e proteínas presentes na matriz íntegra. A banda C–H (3019 cm^{-1}) foi a mais estável entre os espectros, com variação inferior a 8 cm^{-1}, o que é coerente com a manutenção de uma cadeia alifática e olefínica de natureza semelhante à da bixina após a extração [129, 130].

As regiões C=O, C=C e C–O apresentaram deslocamentos de maior magnitude,

mas com um padrão que exige interpretação cautelosa - os valores são praticamente idênticos no extrato e no Thy:Lac puro (tabela 4.5). Isso indica que nessas regiões o espectro do extrato é substancialmente determinado pelo solvente — o timol contribui com absorções C=C aromáticas ($\sim$1550 cm^{-1}) e o ácido lático com carbonila em posição compatível com o deslocamento observado em C=O. A eliminação de componentes polissacarídicos da matriz explica parte da alteração em C–O, mas a sobreposição com as contribuições do NADES impede uma separação inequívoca das bandas.

Tabela 4.5 - Posições das bandas de absorção no infravermelho (cm^{-1}) e deslocamentos espectrais entre a matriz vegetal *Bixa orellana*, o extrato otimizado e o solvente eutético Thy:Lac (2:1).

Região	***B. orellana***	**Extrato otimizado**	**Thy:Lac (2:1)**	**Δ (cm^{-1})**
O–H	3353,60	3392,22	3395,80	$+38{,}63^a$
C–H	3019,14	3011,69	3026,60	$-7{,}45^a$
C=O	1707,12	1662,39	1662,39	$-44{,}73^a$
C=C	1490,94	1550,57	1550,57	$+59{,}64^a$
C–O	1200,20	1334,39	1334,39	$+134{,}18^a$

[a] Δ calculado em relação à matriz vegetal *Bixa orellana*. Deslocamentos idênticos no extrato otimizado e no Thy:Lac (2:1) nas regiões C=O, C=C e C-O indicam contribuição predominante do solvente nessas bandas.

O FTIR-ATR, por sua natureza, não permite identificar compostos individuais em matrizes complexas nem distinguir, neste caso, a contribuição dos bioativos vegetais da assinatura espectral do solvente nas regiões mais afetadas. A região C–H permanece como a evidência mais consistente de que o extrato preserva compostos com cadeia olefínica intacta, compatíveis com o perfil da bixina. Em conjunto, os dados espectrais indicam alteração do perfil funcional entre a matriz e o extrato, coerente com um processo seletivo de extração de compostos lipofílicos, mas a caracterização química definitiva dos compostos extraídos requer confirmação por métodos cromatográficos.

A análise espectroscópica da *Bixa orellana* evidenciou um sistema extrativo de caráter predominantemente lipofílico, no qual o NADES hidrofóbico Thy:Lac 2:1 exerceu influência marcante sobre o perfil espectral do extrato, dificultando a discriminação entre as contribuições do solvente e as dos compostos vegetais nas principais regiões funcionais. O contraste com o sistema seguinte é, portanto, tanto químico quanto metodológico. A *Genipa americana* é uma matriz com perfil de bioativos essencialmente polar — dominado

por iridoides glicosilados como o geniposídeo e por compostos fenólicos — e o solvente eutético empregado para sua extração, o ChCl:Lac 1:2, é de natureza hidrofílica. Essa diferença de polaridade entre os dois sistemas afeta diretamente a interpretação dos espectros de FTIR, enquanto no caso do urucum a sobreposição entre solvente e extrato limitou as inferências sobre a composição do material extraído, no caso do jenipapo espera-se que o perfil espectral do extrato preserve características mais discerníveis da matriz vegetal, justamente porque o solvente e os analitos compartilham o mesmo caráter polar sem que um domine completamente o outro.

Genipa americana apresenta um perfil de bioativos predominantemente polar, com destaque para iridoides glicosilados como o geniposídeo e compostos fenólicos, cujos grupos funcionais — hidroxilas, ligações glicosídicas e insaturações aromáticas — produzem absorções definidas no infravermelho. A comparação entre os espectros da matriz vegetal, do extrato otimizado e do solvente eutético ChCl:Lac 1:2 (figura 4.8), permite avaliar em que medida o extrato preserva características espectrais da planta que podem ser discriminadas em relação ao perfil do solvente puro.

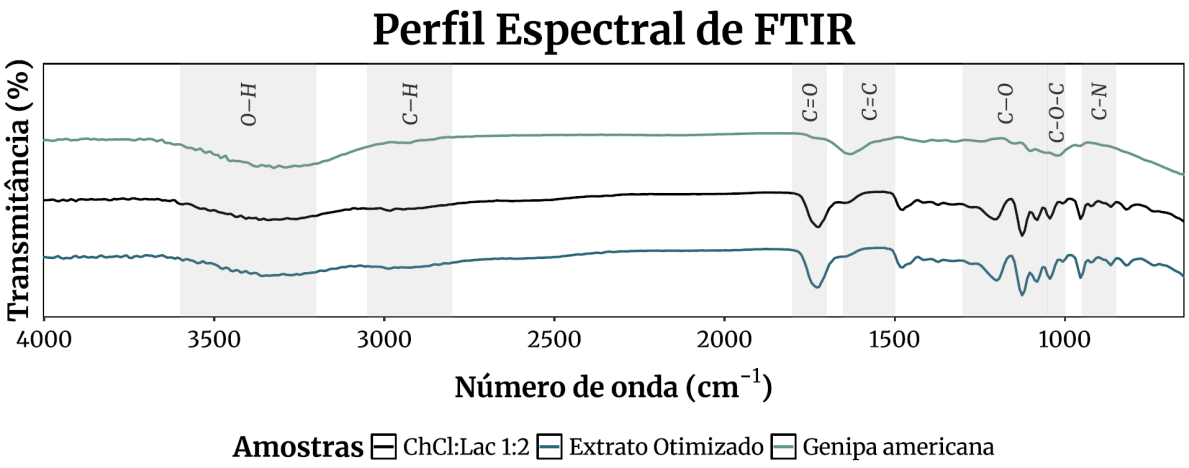


Figura 4.8 - Perfis espectrais de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) de *Genipa americana*, do sistema ChCl:Lac (1:2) e do extrato otimizado.

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

A região O–H apresentou deslocamentos de pequena magnitude nos três espectros (< 7 cm^{-1}), com posições próximas entre extrato e NADES puro, o que indica que essa região é dominada pela rede de pontes de hidrogênio do ChCl:Lac — comportamento esperado para um solvente hidrofílico com intensa capacidade de associação [100]. O

comportamento da banda C–H foi o mais informativo do conjunto: extrato (+37,3 cm^{-1}) e ChCl:Lac puro (59,6 cm^{-1}) deslocam em direções opostas em relação à matriz, o que torna improvável que o espectro do extrato nessa região seja apenas uma reprodução do solvente. O deslocamento para ∼3071 cm^{-1} é compatível com contribuições de C–H aromático ou olefínico provenientes dos compostos vegetais.

A ausência de absorção identificável na região C=O nos três espectros pode refletir mascaramento pelo ácido lático (∼1720 cm^{-1}) ou absorção larga de água na faixa 1600–1700 cm^{-1}, ambos comuns em sistemas NADES hidrofílicos. Essa ausência não exclui a presença de compostos carbonilados no extrato, mas delimita o que pode ser concluído a partir dos dados espectrais disponíveis.

As regiões C=C (∼1543 cm^{-1}), C–O–C (∼1081 cm^{-1}) e C–N (∼991 cm^{-1}) apresentaram posições idênticas na matriz e no extrato, com valores distintos — ou ausência de banda — no ChCl:Lac puro (tabela 4.6). Esse padrão de conservação posicional representa a evidência espectral mais robusta de que essas regiões do extrato refletem compostos de origem vegetal. A posição de C–O–C é compatível com ligações glicosídicas de iridoides como o geniposídeo, e C=C é coerente com insaturações aromáticas de compostos fenólicos. A atribuição de C–N deve ser tratada como provisória, pois a absorção em ∼991 cm^{-1} situa-se abaixo da faixa convencional para esse grupo funcional.

Tabela 4.6 - Posições das bandas de absorção no infravermelho (cm^{-1}) e deslocamentos espectrais entre a matriz vegetal *Genipa americana*, o extrato otimizado e o solvente eutético ChCl:Lac (1:2).

Região	***G. americana***	**Extrato otimizado**	**ChCl:Lac (1:2)**	**Δ (cm^{-1})**
O–H	3356,01	3349,47	3352,31	$-6{,}54^{a}$
C–H	3034,05	3071,33	2974,42	$+37{,}27^{a}$
C=O	ND	ND	ND	—
C=C	1543,12	1543,12	ND	$0{,}00^{a}$
C–O–C	1080,93	1080,93	1140,57	$0{,}00^{a}$
C–N	991,47	991,47	924,38	$0{,}00^{a,b}$

[a] Δ calculado em relação à matriz vegetal *Genipa americana*. [b] Atribuição a C-N de caráter provisório; a absorção em ∼991 cm^{-1} situa-se abaixo da faixa convencional para esse grupo funcional e pode corresponder a deformações fora do plano de sistemas insaturados presentes nos compostos vegetais. ND: não detectado, componente sem absorção característica nessa região.

Em contraste com o sistema de *Bixa orellana*, no qual o NADES hidrofóbico dominava o espectro do extrato nas principais regiões funcionais, o ChCl:Lac 1:2 permite dis-

criminar bandas de origem vegetal nas regiões C=C, C–O–C e C–H. Os dados espectrais, dentro das limitações inerentes ao FTIR-ATR em matrizes complexas, são compatíveis com a extração de compostos polares com ligações insaturadas e glicosídicas, consistente com o perfil químico esperado para Genipa americana e com a capacidade do sistema hidrofílico de solubilizar compostos dessa natureza por interações via pontes de hidrogênio.

4.4.3 Estabilidade dos NADES e Extratos

4.4.3.1 Análise de pH

Os valores de pH registrados ao longo dos 150 dias de armazenamento situaram-se integralmente na faixa fortemente ácida, entre 1,75 e 2,48 (figura 4.9), o que é coerente com a presença do ácido lático como doador de ligação de hidrogênio em ambos os sistemas [131, 132]. Essa acidez acentuada é característica de NADES formulados com ácidos orgânicos de baixo pKa e reflete a natureza das interações estabelecidas na rede supramolecular do solvente [133]. A reprodutibilidade das medições foi alta em todos os grupos e pontos de tempo avaliados, o que confere consistência aos padrões observados e sustenta a interpretação de que as variações entre os pontos de coleta têm origem no comportamento dos próprios sistemas.

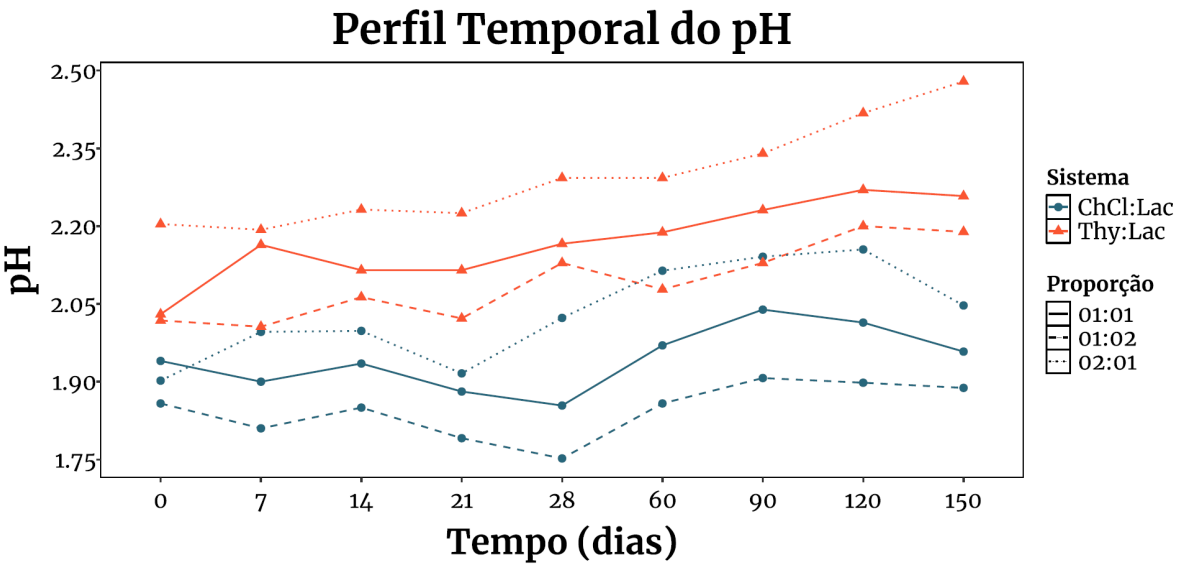


Figura 4.9 - Variação do pH ao longo do tempo.
Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Nos sistemas ChCl:Lac (tabela 4.7) nas proporções 1:1 e 1:2, o pH apresentou padrão não monotônico ao longo do tempo. Houve queda progressiva até o dia 28, seguida de

recuperação parcial nos meses subsequentes, com valores no dia 150 próximos aos iniciais. A amplitude total dessas oscilações ficou abaixo de 0,19 unidades de pH. Esse comportamento oscilatório, sem tendência líquida consistente ao longo do período, é compatível com uma reorganização da rede de ligações de hidrogênio em resposta a variações ambientais de temperatura e umidade relativa durante o armazenamento [60]. Sistemas baseados em cloreto de colina e ácido lático são conhecidos por absorver umidade de forma moderada, e pequenas flutuações na quantidade de água incorporada podem alterar transitoriamente o equilíbrio ácido-base sem comprometer a estrutura supramolecular do solvente [134, 135]. A capacidade de retorno a valores próximos ao inicial — particularmente evidente no sistema 1:2 — reforça a interpretação de que esses sistemas mantêm uma condição de equilíbrio relativamente estável ao longo do tempo.

O sistema ChCl:Lac 2:1 apresentou comportamento ligeiramente diferente, o pH aumentou progressivamente desde o dia 0 (1,902) até o dia 120 (2,155), com queda parcial no dia 150 (2,047). A variação total foi de 0,253 unidades de pH — maior do que nas outras proporções do mesmo sistema. A proporção 2:1 implica maior concentração relativa de cloreto de colina em relação ao ácido lático, o que pode resultar em menor disponibilidade de espécies ácidas livres e, consequentemente, em maior sensibilidade do pH a pequenas perturbações na composição do sistema ao longo do armazenamento [17, 134].

Nos sistemas Thy:Lac (tabela 4.8), o padrão temporal foi predominantemente crescente e mais consistente ao longo dos cinco meses. Os sistemas 1:1 e 1:2 exibiram aumento progressivo do pH, com variação total de aproximadamente 0,23 e 0,17 unidades, respectivamente, enquanto o sistema 2:1 foi o que apresentou o comportamento mais acentuado - o pH aumentou continuamente de 2,204 (dia 0) até 2,479 (dia 150), sem reversão clara, representando a maior variação total observada entre todas as condições avaliadas. A tendência crescente e sustentada nesses sistemas sugere que fatores relacionados à composição do Thy:Lac — particularmente a presença do timol como componente majoritário — contribuem para um deslocamento progressivo do equilíbrio ácido-base ao longo do armazenamento.

Tabela 4.7 - Valores de pH ao longo do tempo de armazenamento para o sistema ChCl:Lac em diferentes proporções.

Concentração	Tempo	Média ± SD	Concentração	Tempo	Média ± SD
1:1	0 Dia	1,940 ± 0,002^{d}	1:1	60 Dias	1,970 ± 0,002^{f}
1:2	0 Dia	1,858 ± 0,002^{e}	1:2	60 Dias	1,858 ± 0,002^{e}
2:1	0 Dia	1,902 ± 0,002^{a}	2:1	60 Dias	2,114 ± 0,002^{f}
1:1	7 Dias	1,900 ± 0,002^{c}	1:1	90 Dias	2,039 ± 0,002^{h}
1:2	7 Dias	1,810 ± 0,002^{c}	1:2	90 Dias	1,907 ± 0,002^{h}
2:1	7 Dias	1,996 ± 0,002^{c}	2:1	90 Dias	2,141 ± 0,002^{g}
1:1	14 Dias	1,935 ± 0,002^{d}	1:1	120 Dias	2,014 ± 0,002^{g}
1:2	14 Dias	1,850 ± 0,002^{d}	1:2	120 Dias	1,898 ± 0,002^{g}
2:1	14 Dias	1,998 ± 0,001^{c}	2:1	120 Dias	2,155 ± 0,002^{h}
1:1	21 Dias	1,881 ± 0,002^{b}	1:1	150 Dias	1,958 ± 0,002^{e}
1:2	21 Dias	1,791 ± 0,002^{b}	1:2	150 Dias	1,888 ± 0,002^{f}
2:1	21 Dias	1,916 ± 0,002^{b}	2:1	150 Dias	2,047 ± 0,002^{e}
1:1	28 Dias	1,854 ± 0,002^{a}			
1:2	28 Dias	1,752 ± 0,002^{a}			
2:1	28 Dias	2,023 ± 0,002^{d}			

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento dentro de cada combinação de sistema e proporção, com base em estimativas marginais derivadas de modelo linear misto, seguidas de comparações múltiplas com ajuste de Bonferroni ($p < 0,05$).

Uma hipótese plausível para esse comportamento é a absorção diferenciada de umidade atmosférica pelo timol. Compostos fenólicos de caráter anfifílico, como o timol, podem estabelecer interações com moléculas de água de forma mais intensa do que o cloreto de colina, e a incorporação progressiva de água ao sistema atuaria como diluente das espécies ácidas, elevando gradualmente o pH [136]. Esse mecanismo é consistente com o fato de a proporção 2:1 — onde a concentração relativa de timol é maior — ter apresentado a variação mais pronunciada. Adicionalmente, a possibilidade de esterificação parcial entre componentes do sistema, com consumo de espécies ácidas livres ao longo do tempo, foi documentada para DES baseados em cloreto de colina e ácidos carboxílicos [137]; embora essa reação seja mais relevante em temperaturas elevadas, sua ocorrência em menor extensão à temperatura ambiente não pode ser descartada.

Comparando com a literatura, os valores de pH observados são compatíveis com os reportados para sistemas NADES semelhantes. Pozharitskaya e colaboradores [132] descrevem pH entre 1,5 e 2,5 para formulações à base de ácido lático, dependendo da

composição e da proporção molar. Como também, Pires e colaboradores [17], em sistemas ChCl:ácido lático, demonstraram que o pH varia sistematicamente com a razão molar e que a incorporação de água altera o comportamento ácido-base de forma mensurável. A relativa estabilidade dos sistemas ChCl:Lac 1:1 e 1:2 está em linha com os achados de Spaggiari em 2025 [60], que documentaram manutenção das propriedades físico-químicas de NADES ao longo de períodos prolongados. O comportamento crescente e consistente dos sistemas Thy:Lac, por sua vez, é menos discutido na literatura de estabilidade a longo prazo, o que reforça a necessidade de monitoramento complementar para esses sistemas em estudos futuros.

Tabela 4.8 - Valores de pH ao longo do tempo de armazenamento para o sistema Thy:Lac em diferentes proporções.

Concentração	Tempo	Média ± SD	Concentração	Tempo	Média ± SD
1:1	0 Dia	2,030 ± 0,002^{a}	1:1	60 Dias	2,188 ± 0,002^{d}
1:2	0 Dia	2,018 ± 0,002^{b}	1:2	60 Dias	2,078 ± 0,002^{d}
2:1	0 Dia	2,204 ± 0,002^{b}	2:1	60 Dias	2,293 ± 0,002^{e}
1:1	7 Dias	2,164 ± 0,002^{c}	1:1	90 Dias	2,231 ± 0,002^{e}
1:2	7 Dias	2,006 ± 0,002^{a}	1:2	90 Dias	2,129 ± 0,002^{e}
2:1	7 Dias	2,193 ± 0,002^{a}	2:1	90 Dias	2,340 ± 0,002^{f}
1:1	14 Dias	2,115 ± 0,002^{b}	1:1	120 Dias	2,270 ± 0,002^{g}
1:2	14 Dias	2,063 ± 0,002^{c}	1:2	120 Dias	2,200 ± 0,002^{g}
2:1	14 Dias	2,232 ± 0,002^{d}	2:1	120 Dias	2,418 ± 0,002^{g}
1:1	21 Dias	2,115 ± 0,002^{b}	1:1	150 Dias	2,258 ± 0,002^{f}
1:2	21 Dias	2,022 ± 0,002^{b}	1:2	150 Dias	2,189 ± 0,002^{f}
2:1	21 Dias	2,225 ± 0,002^{c}	2:1	150 Dias	2,479 ± 0,002^{h}
1:1	28 Dias	2,166 ± 0,002^{c}			
1:2	28 Dias	2,129 ± 0,002^{e}			
2:1	28 Dias	2,293 ± 0,002^{e}			

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento dentro de cada combinação de sistema e proporção, com base em estimativas marginais derivadas de modelo linear misto, seguidas de comparações múltiplas com ajuste de Bonferroni ($p < 0,05$).

Cabe destacar, por fim, que o pH constitui um parâmetro global e indireto de estabilidade. Variações na faixa observada — inferiores a 0,3 unidades em todos os sistemas — podem ocorrer sem que haja degradação detectável dos compostos bioativos ou comprometimento da integridade estrutural do NADES [138]. Da mesma forma, a manutenção do pH ao longo do tempo não garante que os compostos extraídos permaneçam intactos, pois reações de oxidação, hidrólise ou isomerização podem ocorrer sem alterar o pH de

forma mensurável [139, 140].

Os dois sistemas selecionados pelo planejamento Box-Behnken como mais eficientes para a extração de compostos bioativos — ChCl:Lac 1:2 e Thy:Lac 2:1 — apresentaram perfis de estabilidade de pH bastante distintos ao longo do armazenamento. O sistema ChCl:Lac 1:2 demonstrou alta estabilidade, com oscilações de pequena amplitude e ausência de tendência líquida ao longo dos 150 dias, o que sugere que suas propriedades ácido-base se mantiveram essencialmente constantes durante o período em que as extrações foram realizadas. Esse comportamento é favorável à reprodutibilidade das condições extrativas, pois um pH estável contribui para a manutenção do grau de protonação dos compostos-alvo e, consequentemente, de sua solubilidade no solvente [133, 141].

O sistema Thy:Lac 2:1, por outro lado, foi o que apresentou a maior variação de pH entre todas as condições avaliadas, com incremento contínuo ao longo de todo o período. Ainda assim, o pH desse sistema permaneceu na faixa fortemente ácida durante todo o experimento, e a variação observada não impediu que ele fosse o solvente com maior capacidade extrativa no planejamento experimental. Isso sugere que, para esse sistema, a extração de bioativos pode ser menos sensível a pequenas variações de pH do que a outros fatores otimizados pelo BBD, como o tempo de extração e a temperatura de extração. Esse resultado também reforça a importância de considerar a estabilidade do solvente como critério complementar na seleção de NADES para aplicações práticas - sistemas com alto desempenho extrativo e baixa estabilidade temporal demandam maior atenção ao controle das condições de armazenamento e ao tempo entre a preparação e o uso [60, 140]. Em nenhum dos sistemas, contudo, houve transição do regime fortemente ácido, indicando que as características gerais de acidez dos NADES foram preservadas ao longo dos cinco meses de armazenamento.

4.4.3.2 Análise Colorimétrica

A estabilidade cromática do extrato otimizado de *Bixa orellana* (figura 4.10 e tabela 4.9) foi avaliada ao longo de 28 dias por meio da variação total de cor (ΔE^*), calculada com base nos parâmetros L*, a* e b* da escala CIELab em relação ao ponto de referência correspondente ao tempo zero ($L_0 = 7{,}77$; $a_0 = 15{,}9$; $b_0 = 9{,}89$). Esses valores descrevem um sistema de coloração escura, com componente avermelhada pronunciada e

leve contribuição amarelada, padrão característico da bixina em meio concentrado.

O padrão temporal observado não é compatível com degradação progressiva. A maior variação cromática ocorreu no 7º dia, seguida de redução abrupta e posterior estabilização entre os dias 14 e 28, período em que os valores de ΔE* se mantiveram próximos e sem diferenças detectáveis entre si. Esse comportamento sugere uma reorganização inicial do sistema extrato-NADES nos primeiros dias após a extração — possivelmente relacionada ao ajuste conformacional das moléculas de bixina na matriz do solvente ou a efeitos físicos como redistribuição coloidal —, seguida de estabilização. A ausência de incremento progressivo ao longo do período mais prolongado de armazenamento é o dado mais relevante para a avaliação da estabilidade, pois indica que os cromóforos presentes não sofreram alteração sustentada detectável pela colorimetria.

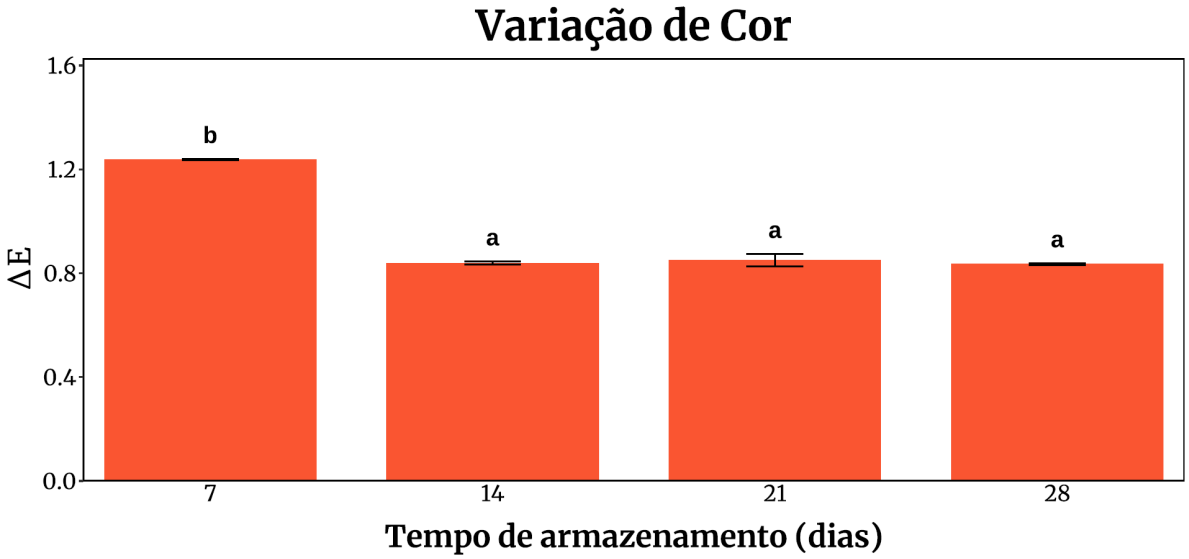


Figura 4.10 - Variação total de cor (E) ao longo do tempo de armazenamento para o extrato otimizado de *Bixa orellana*.

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Na escala CIELab, valores de ΔE* inferiores a 1,0 são considerados imperceptíveis ao observador humano mesmo em condições controladas de avaliação, enquanto valores entre 1,0 e 2,0 são detectáveis apenas por observadores treinados. Nesse contexto, o valor máximo observado no 7º dia situa-se no limiar inferior da perceptibilidade, e os registros subsequentes permanecem abaixo desse limiar, o que reforça a interpretação de alta estabilidade cromática do extrato ao longo do período avaliado.

A bixina é conhecida por sua sensibilidade à luz, ao oxigênio e ao calor, sendo

Tabela 4.9 - Variação de cor (ΔE) de *Bixa orellana* durante o armazenamento.

Tempo	**Média ± SD**
7 Dias	$1{,}238 \pm 0{,}00276^{b}$
14 Dias	$0{,}839 \pm 0{,}0105^{a}$
21 Dias	$0{,}850 \pm 0{,}0405^{a}$
28 Dias	$0{,}835 \pm 0{,}00539^{a}$

Valores representam média ± desvio padrão. Diferenças significativas entre os tempos de armazenamento foram avaliadas por ANOVA, seguida do teste de Tukey ($p < 0{,}05$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento.

a isomerização e a oxidação da cadeia poliênica os principais mecanismos de degradação descritos na literatura [142, 143]. A ausência de incremento progressivo de ΔE* ao longo dos 28 dias sugere que a matriz NADES pode ter exercido papel protetor sobre os pigmentos, limitando o contato com fatores degradantes. Resultados análogos foram relatados por Souza [144] para a cianidin-3-glucosídeo em solventes eutéticos profundos, em que o ambiente viscoso do sistema conferiu maior estabilidade cromática ao pigmento em comparação com soluções aquosas convencionais. De acordo com Maragoni-Santos [145], também observaram boa retenção de cor em extratos de *Bixa orellana* obtidos com NADES à base de mesocarpo de babaçu, corroborando a adequação desse tipo de solvente para a preservação de pigmentos carotenoídicos.

Com base na consistência das variações de ΔE* observadas ao longo do armazenamento, o extrato otimizado de *Bixa orellana* pode ser classificado como de alta estabilidade cromática no período avaliado. A elevação pontual registrada no 7^{o} dia não configurou tendência de degradação sustentada, sendo seguida de plena estabilização cromática que se manteve inalterada nos três períodos subsequentes. Esse comportamento é compatível com a manutenção da integridade estrutural dos cromóforos durante a fase mais prolongada do armazenamento, ainda que a confirmação química desse resultado requeira análises complementares.

Em contraste com o comportamento observado para *Bixa orellana*, cujo extrato demonstrou estabilização cromática ao longo do período avaliado, o extrato de *Genipa americana* apresentou um padrão temporal de natureza distinta, que reflete a complexidade química particular dessa matriz. Enquanto a bixina, principal cromóforo do urucum, é um composto relativamente estável em condições de armazenamento controlado — desde

que protegida de luz e oxigênio —, o sistema cromóforo do jenipapo é inerentemente dinâmico, envolvendo reações contínuas de formação e transformação de pigmentos derivados da genipina que, por sua própria natureza química, não tendem ao equilíbrio cromático em curto prazo. Essa diferença fundamental entre os dois sistemas impõe abordagens interpretativas distintas - no caso do urucum, a estabilidade cromática pode ser razoavelmente associada à preservação dos cromóforos presentes; no caso do jenipapo, variações de ΔE^* ao longo do tempo não distinguem, por si sós, entre degradação e desenvolvimento de pigmento, exigindo maior cautela na interpretação dos dados colorimétricos.

A estabilidade cromática do extrato otimizado de *Genipa americana* (figura 4.11 e tabela 4.10) foi avaliada ao longo de 28 dias por meio da variação total de cor (ΔE^*), calculada com base nos parâmetros L*, a* e b* da escala CIELab em relação ao ponto de referência correspondente ao tempo zero ($L_0 = 7{,}27$; $a_0 = 4{,}78$; $b_0 = 7{,}19$). Esses valores descrevem um sistema de coloração escura, com baixa saturação vermelha e contribuição moderada do componente amarelo, refletindo o caráter predominantemente incolor ou levemente esverdeado do suco fresco de jenipapo antes do desenvolvimento dos pigmentos azuis derivados da genipina.

Diferentemente do que seria esperado em um sistema cromaticamente estável, os valores de ΔE^* não convergiram para uma faixa constante ao longo do tempo. A trajetória observada é não monotônica, após uma redução relativa ao $14^{\underline{o}}$ dia, os valores de ΔE^* aumentaram progressivamente até atingir o maior registro ao $28^{\underline{o}}$ dia, com cada ponto de coleta ocupando uma posição distinta ao longo do período avaliado. Esse perfil é coerente com dinâmicas químicas complexas, típicas de sistemas em que processos de formação e degradação de cromóforos ocorrem de forma concomitante e com cinéticas distintas.

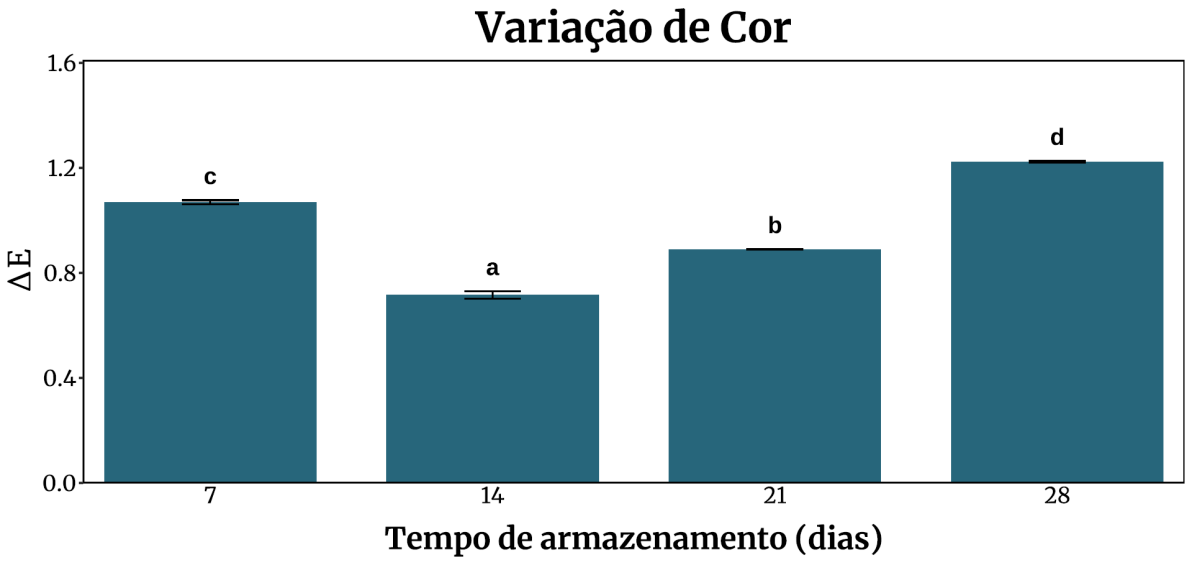


Figura 4.11 - Variação total de cor (E) ao longo do tempo de armazenamento para o extrato otimizado de *Genipa americana*.

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

A interpretação desse comportamento deve considerar a natureza peculiar dos compostos cromóforos do jenipapo. O principal responsável pela coloração característica de *Genipa americana* é a genipina, um iridoide resultante da hidrólise do geniposídeo, que reage espontaneamente com compostos aminados — incluindo aminoácidos livres, proteínas e aminas primárias — formando pigmentos azuis de alta massa molecular por meio de reações de polimerização e ciclização. Esse processo de desenvolvimento de cor é dependente do tempo, da temperatura e da disponibilidade de grupos amino na matriz, e é inerentemente progressivo, podendo continuar por dias ou semanas após a extração [146]. À luz dessa química, o aumento de ΔE^* entre os dias 21 e 28 é compatível com o avanço dessas reações de formação de pigmento — um processo de desenvolvimento cromático, e não necessariamente de degradação. A queda relativa observada ao $14^{\underline{o}}$ dia pode refletir um equilíbrio transitório entre a formação inicial de intermediários incolores e a polimerização subsequente em cromóforos azuis estáveis, embora essa hipótese careça de confirmação analítica direta.

Tabela 4.10 - Variação de cor (ΔE) de *Genipaa americana* durante o armazenamento.

Tempo	**Média ± SD**
7 Dias	$1{,}070 \pm 0{,}0130^{c}$
14 Dias	$0{,}716 \pm 0{,}0253^{a}$
21 Dias	$0{,}889 \pm 0{,}00203^{b}$
28 Dias	$1{,}223 \pm 0{,}00617^{d}$

Valores representam média ± desvio padrão. Diferenças significativas entre os tempos de armazenamento foram avaliadas por ANOVA, seguida do teste de Tukey ($p < 0{,}05$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento.

É importante considerar, ainda, que a composição do NADES pode influenciar diretamente essa dinâmica. Caso o sistema solvente contenha componentes com grupos amino livres, a genipina poderia reagir com o próprio solvente durante o armazenamento, acelerando ou modificando o desenvolvimento cromático em comparação com extratos convencionais. Esse efeito de matriz tornaria o comportamento de ΔE^* ao longo do tempo um reflexo tanto da transformação do pigmento quanto da interação extrato-solvente, complicando qualquer interpretação baseada exclusivamente na colorimetria. Os iridoides de *Genipa americana* são adicionalmente sensíveis a variações de pH, temperatura e presença de oxigênio, fatores que podem ter contribuído para a variabilidade temporal observada [146].

Com base na trajetória temporal observada e na ausência de estabilização cromática durante os 28 dias avaliados, o extrato otimizado de *Genipa americana* pode ser classificado como de estabilidade cromática moderada a baixa no período de armazenamento estudado. O comportamento não monotônico de ΔE^*, com variações estatisticamente distinguíveis em todos os pontos de coleta, indica que o sistema permaneceu em transformação cromática ativa ao longo de todo o experimento. Esse padrão é consistente com a química reativa da genipina e impõe cautela quanto ao uso do extrato sem etapas adicionais de estabilização, especialmente em aplicações que exijam reprodutibilidade de cor ao longo do tempo.

4.5 Conclusões

A otimização por Box–Behnken/RSM produziu condições operacionais validadas experimentalmente para ambos os sistemas, com ganhos expressivos em relação à tri-

agem preliminar — particularmente para ChCl:Lac/*Genipa americana*, cujo rendimento de compostos fenólicos mais que dobrou após a adequação das condições de extração. Esse resultado evidencia que o potencial extrativo dos NADES selecionados no capítulo anterior estava sendo subestimado em condições não otimizadas, e que a etapa de otimização foi determinante para sua expressão plena.

Os dois sistemas estudados apresentaram comportamentos fundamentalmente distintos quanto aos fatores que controlam a extração. No sistema Thy:Lac/*Bixa orellana*, a proporção molar e a temperatura atuaram de forma independente como co-determinantes do rendimento de carotenoides — resultado coerente com o caráter apolar dos pigmentos-alvo e com a necessidade de condições energéticas mais elevadas para sua mobilização a partir da matriz sólida. No sistema ChCl:Lac/*Genipa americana*, a composição do solvente foi o único fator individualmente significativo, indicando que, nesse sistema hidrofílico, a disponibilidade de sítios iônicos e doadores de ligações de hidrogênio condiciona a extração de compostos fenólicos polares de forma mais determinante do que temperatura ou tempo, dentro das faixas estudadas. Esse contraste reforça que a seleção criteriosa da proporção molar não é apenas uma etapa prévia à otimização, mas o principal parâmetro de controle do processo em sistemas NADES hidrofílicos aplicados a matrizes ricas em fenólicos.

A caracterização por FTIR-ATR forneceu evidências espectrais compatíveis com a extração seletiva dos compostos-alvo em ambos os sistemas, sem indicação de degradação estrutural induzida pelo processo. No entanto, o grau de sobreposição entre as assinaturas espectrais do solvente e dos compostos extraídos foi diferente. No sistema hidrofóbico Thy:Lac, o NADES dominou o espectro do extrato nas principais regiões funcionais, limitando as inferências possíveis a partir dos dados espectrais; no sistema hidrofílico ChCl:Lac, foi possível discriminar bandas de origem vegetal compatíveis com iridoides glicosilados e compostos fenólicos. Essa assimetria interpretativa é inerente à natureza dos sistemas e deve ser considerada na caracterização espectroscópica de extratos obtidos com NADES hidrofóbicos.

A avaliação antioxidante confirmou que as condições otimizadas preservaram a funcionalidade dos bioativos extraídos. Os dois sistemas produziram extratos com perfis antioxidantes qualitativamente distintos — o urucum com maior reatividade frente ao

ABTS, consistente com o caráter lipofílico dos carotenoides; o jenipapo com desempenho superior por DPPH e FRAP, reflexo da maior diversidade de mecanismos antioxidantes dos compostos fenólicos hidrofílicos. O surgimento de atividade antioxidante mensurável por DPPH no extrato otimizado de jenipapo, ausente na triagem preliminar, é o resultado mais direto do impacto da otimização sobre a qualidade funcional do extrato.

A avaliação de estabilidade introduziu uma tensão relevante - o sistema Thy:Lac 2:1, identificado como condição ótima para extração de carotenoides, foi simultaneamente o que apresentou maior variação de pH ao longo do armazenamento. Embora ambos os sistemas tenham permanecido em regime fortemente ácido durante os cinco meses avaliados, esse comportamento indica que alto desempenho extrativo e estabilidade temporal não são propriedades necessariamente coincidentes em sistemas NADES, e que critérios de estabilidade devem integrar os critérios de seleção operacional. A estabilidade cromática dos extratos seguiu o mesmo padrão diferenciado - o extrato de urucum estabilizou-se rapidamente após reorganização inicial, com variações subsequentes imperceptíveis ao observador humano; o extrato de jenipapo permaneceu em transformação cromática ativa ao longo de todo o período, comportamento atribuível à química reativa da genipina e que impõe restrições ao uso desse extrato em aplicações dependentes de reprodutibilidade visual sem etapas adicionais de estabilização.

Em conjunto, os resultados deste capítulo estabelecem as condições otimizadas de extração, fornecem evidências espectroscópicas da compatibilidade entre solvente e compostos-alvo e delimitam os limiares de estabilidade operacional dos sistemas desenvolvidos, constituindo a base experimental necessária para os capítulos seguintes da dissertação.

Capítulo 5

Encapsulação de extratos obtidos com solventes eutéticos naturais: desempenho de encapsulação e digestibilidade in vitro

5.1 Introdução

Compostos bioativos como carotenoides e compostos fenólicos são quimicamente instáveis quando expostos a fatores ambientais como luz, calor, oxigênio e variações de pH. Essa instabilidade compromete sua atividade antioxidante e reduz a biodisponibilidade após o consumo, o que limita a aplicação direta desses extratos em matrizes alimentícias ou farmacêuticas [147,148]. Esse problema persiste mesmo quando os extratos são obtidos por métodos de extração otimizados, como os que utilizam solventes eutéticos naturais, pois a estabilidade dos compostos ao longo do armazenamento e nas condições do trato gastrointestinal não é garantida apenas pelo processo de obtenção.

A encapsulação é uma estratégia tecnológica consolidada para contornar essas limitações. Ao envolver o material bioativo em uma matriz carreadora, é possível protegê-lo contra degradação durante o processamento, estender sua vida útil e modular a liberação dos compostos no organismo [149, 150]. No contexto de extratos obtidos com NADES, essa proteção torna-se ainda mais relevante, uma vez que a composição dos solventes pode influenciar as propriedades físico-químicas do encapsulado.

Entre os materiais de parede disponíveis, a combinação de maltodextrina e goma arábica é empregada para compostos fenólicos e pigmentos naturais. A maltodextrina apresenta boa solubilidade, baixo custo e capacidade de formação de matriz protetora, enquanto a goma arábica contribui com propriedades emulsificantes e maior retenção de compostos sensíveis [151, 152]. O uso combinado desses materiais tem sido associado a

maior eficiência de encapsulação e estabilidade dos compostos bioativos [150, 153].

O método de liofilização é indicado para extratos termossensíveis, pois a remoção de água ocorre em baixas temperaturas e pressão reduzida, preservando a integridade química dos bioativos [147, 154]. Resulta, em geral, em maior retenção da atividade antioxidante mensurada pelos métodos DPPH e ABTS, menor degradação de compostos fenólicos e carotenoides, e melhor capacidade de rehidratação do pó obtido [153, 155].

A avaliação da digestibilidade in vitro é uma etapa importante para estimar o comportamento dos compostos bioativos ao longo do trato gastrointestinal. Ensaios que simulam as fases oral, gástrica e intestinal permitem avaliar a liberação e a bioacessibilidade dos compostos após a digestão, fornecendo informações mais representativas do potencial funcional do sistema encapsulado [148, 149]. No caso de carotenoides, compostos lipofílicos com bioacessibilidade limitada, a encapsulação pode desempenhar papel fundamental na melhoria da disponibilidade desses compostos.

Embora a encapsulação por liofilização com maltodextrina e goma arábica seja bem documentada para extratos convencionais, sua aplicação a extratos obtidos com NADES permanece pouco explorada. A composição química desses solventes — formada por componentes naturais como colina, ácido lático e timol — difere dos solventes orgânicos tradicionais e pode influenciar as interações entre o extrato e o material de parede, afetando a eficiência de encapsulação, bem como a estabilidade e a bioacessibilidade dos compostos durante a digestão in vitro. Estudos que avaliem de forma integrada esses parâmetros, especialmente para extratos ricos em carotenoides e compostos fenólicos provenientes de matrizes amazônicas, ainda são escassos na literatura, configurando uma lacuna que este capítulo busca investigar de forma integrada.

Neste capítulo, os extratos otimizados pela metodologia de superfície de resposta (MSR), apresentados no Capítulo 4 a partir dos sistemas NADES ChCl:Lac e Thy:Lac, foram submetidos ao processo de encapsulação por liofilização com maltodextrina e goma arábica como materiais de parede. Foram avaliados a retenção e o perfil de liberação dos compostos bioativos, e a digestibilidade in vitro dos compostos bioativos, utilizando-se os parâmetros de fenóis totais, carotenoides e atividade antioxidante como indicadores do desempenho do sistema. O objetivo foi avaliar o impacto da encapsulação sobre extratos bioativos previamente otimizados, por meio da determinação da retenção dos compos-

tos, do perfil de liberação durante a digestão in vitro e do comportamento digestivo dos encapsulados, visando o potencial de aplicação tecnológica dos extratos obtidos.

5.2 Materiais

5.2.1 Reagentes Químicos

Os reagentes utilizados neste estudo incluíram maltodextrina e goma arábica como materiais de parede para encapsulação, além de enzimas digestivas e sais empregados na simulação do sistema gastrointestinal (α-amilase, pepsina, pancreatina, lipase e sais biliares). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

5.2.2 Espécies Vegetais

As espécies vegetais empregadas foram *Bixa orellana L.* (urucum) e *Genipa americana L.* (jenipapo), conforme descrito no Capítulo 3 (Seção 3.2.2).

5.3 Métodos

5.3.1 Preparação das Amostras

As amostras foram preparadas conforme metodologia descrita no Capítulo 3 (Seção 3.3.1), incluindo etapas de pré-tratamento, liofilização e moagem, sendo armazenadas ao abrigo da luz até a realização dos ensaios.

5.3.2 Obtenção dos Extratos Bioativos

Os extratos utilizados neste estudo foram obtidos a partir de *Bixa orellana L.* (urucum) e *Genipa americana L.* (jenipapo), conforme metodologia descrita no Capítulo 3 (Seção 3.3.2), empregando solventes eutéticos naturais (NADES) sob as condições ótimas determinadas por metodologia de superfície de resposta no Capítulo 4 (Seção 4.3.3). Os extratos foram posteriormente utilizados nos ensaios de encapsulação e digestibilidade in vitro.

5.3.3 Encapsulação dos Extratos

> *O encapsulamento é uma técnica utilizada para proteger e estabilizar compostos ativos, envolvendo-os em uma matriz ou revestimento que pode ser sólido, líquido ou gasoso. Esse processo resulta em partículas que variam de nano a micrometros, com o composto encapsulado, conhecido como núcleo ou carga útil, sendo aprisionado dentro de um material de casca que atua como barreira protetora. Essa camada protetora preserva as propriedades químicas, físicas e biológicas do material ativo, permitindo sua liberação controlada em condições específicas [156–158].*

A encapsulação dos extratos foi realizada utilizando uma matriz composta por maltodextrina e goma arábica na proporção de 75:25 (m/m), respectivamente. Inicialmente, foi preparada uma solução estoque contendo 25 g de carreadores (18,75 g de maltodextrina e 6,25 g de goma arábica) dissolvidos em 30 mL de água destilada, sob agitação até completa homogeneização, resultando em uma dispersão com aproximadamente 45,5% de sólidos totais.

A partir dessa solução, foram preparadas duas formulações com diferentes proporções entre extrato e material encapsulante (1:5 e 1:3, m/m), considerando a massa de sólidos dos carreadores presentes na solução. Para isso, foram adicionados 1,3 g e 2,27 g de extrato a 15 g da solução estoque, respectivamente, seguidos de homogeneização. As formulações resultantes apresentaram aproximadamente 42% e 40% de sólidos totais, respectivamente, valores calculados com base na fração de sólidos dos carreadores presentes na solução.

A escolha dos materiais de parede, das proporções entre extrato e carreadores, do teor de sólidos totais e do processo de secagem por liofilização foi fundamentada em estudos da literatura [159, 160], com adaptações realizadas em função das características dos extratos obtidos e das condições experimentais adotadas neste trabalho.

As dispersões obtidas foram submetidas à secagem por liofilização, sendo inicialmente congeladas e mantidas por 24 horas no condensador, seguidas de 24 horas sob vácuo em liofilizador (Linha LJJ Freeze Dryer, JJ Científica). Após o processo, os materiais foram obtidos na forma de material particulado seco (pó), sendo armazenados ao abrigo da luz e da umidade e utilizados nas análises subsequentes.

5.3.4 Retenção de Compostos Bioativos

A retenção de compostos bioativos foi determinada com base na relação entre o teor de compostos presentes nos extratos encapsulados e o teor correspondente no extrato livre, com base em adaptações de metodologias descritas na literatura [161]. Os resultados foram normalizados em função da massa de extrato presente nas formulações, considerando a fração mássica de extrato nos sistemas encapsulados.

Essa abordagem permitiu corrigir os efeitos de diluição decorrentes da presença dos materiais de parede, possibilitando a comparação direta entre extratos livres e encapsulados em base equivalente. Os valores de retenção foram expressos em percentual, conforme a equação 5.1:

$$\text{Retenção } (\%) = \frac{\boldsymbol{C_{enc}}}{\boldsymbol{C_{ext}}} \times 100 \tag{5.1}$$

em que:

- C_{enc} corresponde ao teor do composto bioativo no extrato encapsulado, normalizado em função da massa de extrato;
- C_{ext} corresponde ao teor do composto bioativo no extrato livre.

5.3.5 Rendimento de Secagem

O rendimento de secagem foi determinado com base na razão entre a massa final do material seco obtido após a liofilização e a massa inicial da formulação submetida ao processo (extrato + solução de carreadores), sendo expresso em percentual, conforme a equação 5.2, em base úmida, de acordo com a literatura [162] e adaptações às condições experimentais deste estudo.

$$\boldsymbol{R}(\%) = \frac{\boldsymbol{m_f}}{\boldsymbol{m_i}} \times 100 \tag{5.2}$$

em que:

- R é o rendimento de secagem (%);

- m_f é a massa do material liofilizado (g);
- m_i é a massa inicial da formulação (g).

5.3.6 Digestibilidade In Vitro

A digestibilidade in vitro é uma técnica utilizada para avaliar a eficiência dos processos digestivos de alimentos e compostos bioativos em condições controladas. Esse método busca replicar as etapas da digestão humana, incluindo as fases oral, gástrica e intestinal, utilizando enzimas específicas, tampões e ajustes de pH para simular o ambiente gastrointestinal. Dessa forma, permite a estimativa da degradação de proteínas, aminoácidos e outros nutrientes presentes nos alimentos, fornecendo informações críticas sobre a biodisponibilidade e a absorção dos compostos estudados [163, 164].

A digestibilidade in vitro foi realizada conforme o protocolo padronizado pelo método INFOGEST [57], com adaptações, utilizando fluidos simulados que reproduzem as condições do sistema digestivo humano.

Na fase oral, aproximadamente 4,0 g de amostra foram misturados a 8,0 mL de fluido salivar simulado (SSF), contendo α-amilase, sendo a mistura incubada a 37°C por 2 minutos sob agitação.

Em seguida, o bolo formado foi submetido à fase gástrica, com adição de fluido gástrico simulado (SGF) contendo pepsina, e ajuste do pH para 3,0. A digestão foi conduzida a 37°C por 120 minutos, sob agitação constante (200 rpm), com monitoramento e correção periódica do pH.

Posteriormente, o quimo foi transferido para a fase intestinal, sendo combinado com fluido intestinal simulado (SIF), pancreatina, lipase e sais biliares, com ajuste do pH para 7,0. A digestão foi conduzida a 37°C por 120 minutos, sob agitação constante.

Adicionalmente, amostras foram coletadas em tempos específicos ao longo do processo digestivo — 2 minutos na fase oral, 30, 60 e 120 minutos na fase gástrica, e 180 e 240 minutos na fase intestinal — permitindo a avaliação do perfil de liberação dos compostos bioativos, com base em adaptações de protocolos descritos na literatura [162].

Todas as amostras foram coletadas em triplicata, centrifugadas (5000 × g, 4°C, 5–20 minutos) e os sobrenadantes analisados diretamente quanto ao teor de carotenoides,

compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelos ensaios DPPH e ABTS.

5.3.7 Determinação de Compostos Bioativos e Ensaios Antioxidantes

A determinação dos compostos bioativos dos extratos foi realizada por meio da quantificação de compostos fenólicos totais, carotenoides totais e da atividade antioxidante pelos ensaios DPPH e ABTS, conforme metodologias descritas no Capítulo 3 (Seção 3.3.4).

As análises foram conduzidas em triplicata, utilizando espectrofotômetro de microplacas (EPOCH2, Biotek), sendo os resultados utilizados para avaliação do desempenho de encapsulação e digestibilidade in vitro.

5.3.7.1 Teor de Fenólicos Totais (TPC)

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado conforme metodologia descrita no Capítulo 3 (Seção 3.3.4.1), sendo os resultados utilizados na avaliação do desempenho de encapsulação e digestibilidade in vitro.

5.3.7.2 Teor de Carotenoides Totais (TCC)

O teor de carotenoides totais foi determinado conforme metodologia descrita no Capítulo 3 (Seção 3.3.4.2), sendo os resultados utilizados na avaliação do desempenho de encapsulação e digestibilidade in vitro.

5.3.7.3 Ensaio 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

A atividade antioxidante pelo ensaio DPPH foi determinada conforme metodologia descrita no Capítulo 3 (Seção 3.3.4.3), sendo os resultados utilizados na avaliação do desempenho de encapsulação e digestibilidade in vitro.

5.3.7.4 Ensaio 2,2′-azino-bis(3-etilben zotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS)

A atividade antioxidante pelo ensaio ABTS foi determinada conforme metodologia descrita no Capítulo 4 (Seção 4.3.4.5), sendo os resultados utilizados na avaliação do desempenho de encapsulação e digestibilidade in vitro.

5.3.7.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados conforme a metodologia estatística descrita no Capítulo 3 (Seção 3.3.6), com adaptações para o presente estudo. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão, sendo utilizado o erro padrão da média para representação gráfica.

As diferenças significativas entre os tratamentos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), considerando modelos fatoriais com interação entre os fatores experimentais (tempo, fase digestiva e formulação, conforme aplicável). Quando identificadas diferenças significativas, foi aplicado o teste de comparação múltipla de Tukey, ao nível de 5% de significância.

5.4 Resultados e Discussão

Neste capítulo, são apresentados os resultados da encapsulação dos extratos obtidos de *Bixa orellana* e *Genipa americana* a partir das condições otimizadas previamente, utilizando os sistemas NADES selecionados (Thy:Lac e ChCl:Lac). Serão avaliados o desempenho do processo de encapsulação, por meio da retenção dos compostos bioativos, bem como o perfil de liberação dos compostos bioativos. Adicionalmente, a digestibilidade in vitro será investigada com o objetivo de compreender o comportamento dos compostos ao longo das etapas simuladas do trato gastrointestinal. Os parâmetros de fenóis totais, carotenoides e atividade antioxidante (DPPH e ABTS) serão utilizados como indicadores da estabilidade, liberação e manutenção da funcionalidade dos extratos após o processo de encapsulação.

5.4.1 Desempenho da Encapsulação

Como forma de ilustrar o aspecto visual dos encapsulados obtidos nas diferentes formulações, a figura 5.1 apresenta os pós resultantes da liofilização dos extratos de *Bixa orellana* e *Genipa americana*.

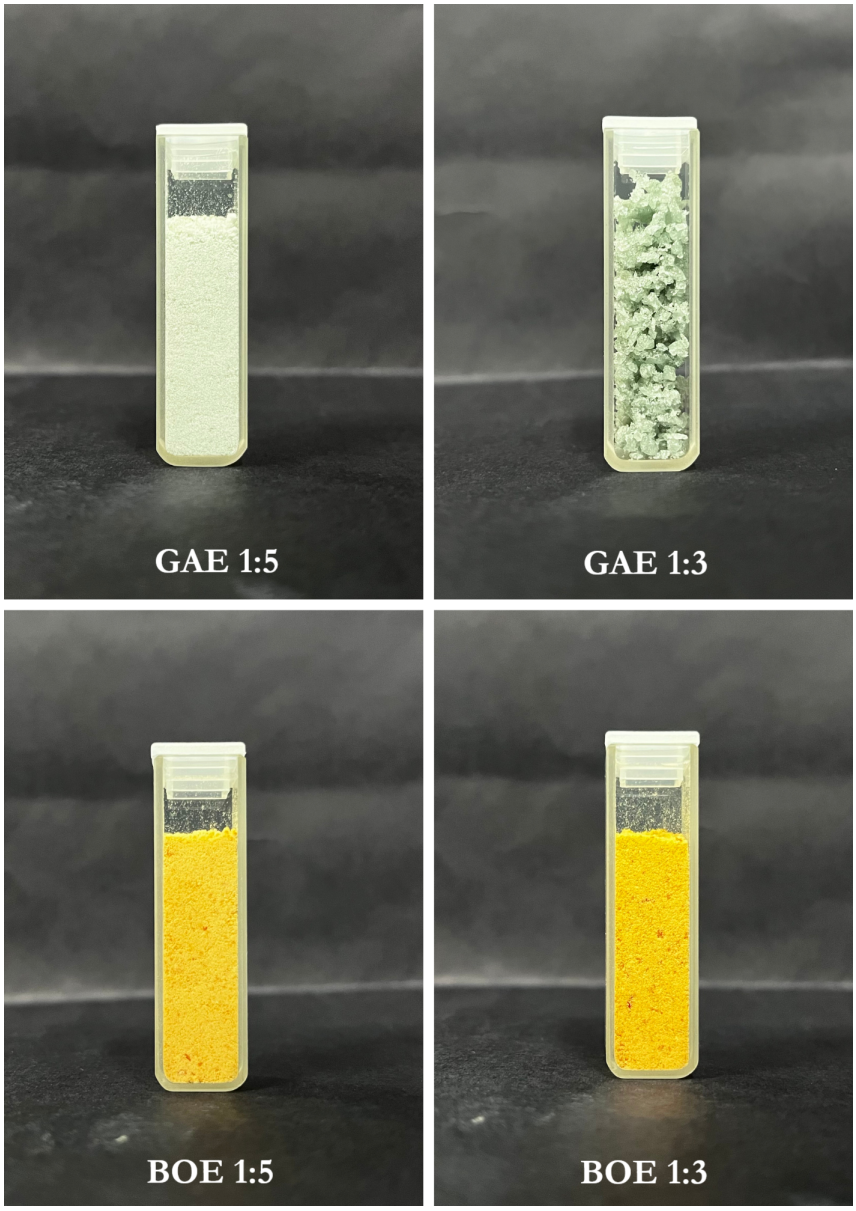


Figura 5.1 - Encapsulados de extratos de *Bixa orellana* (BOE) e *Genipa americana* (GAE) nas formulações 1:3 e 1:5 (relação núcleo:material de parede).

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Os resultados obtidos na figura 5.2 revelam um padrão central e consistente, os fenóis totais do extrato de *Genipa americana* apresentaram retenção substancialmente superior à dos carotenoides do extrato de *Bixa orellana*, independentemente da proporção extrato:carreador adotada. As formulações 1:3 e 1:5 de *G. americana* retiveram, respectivamente, 79,42% e 78,07% dos fenóis totais, enquanto as formulações correspondentes de *B. orellana* retiveram apenas 45,56% e 42,09% dos carotenoides. Essa diferença de aproximadamente 35 pontos percentuais entre os dois grupos de compostos constitui o achado mais relevante da análise e não deve ser atribuída à formulação em si, mas sim à

natureza química dos compostos encapsulados e à sua interação com a matriz carreadora.

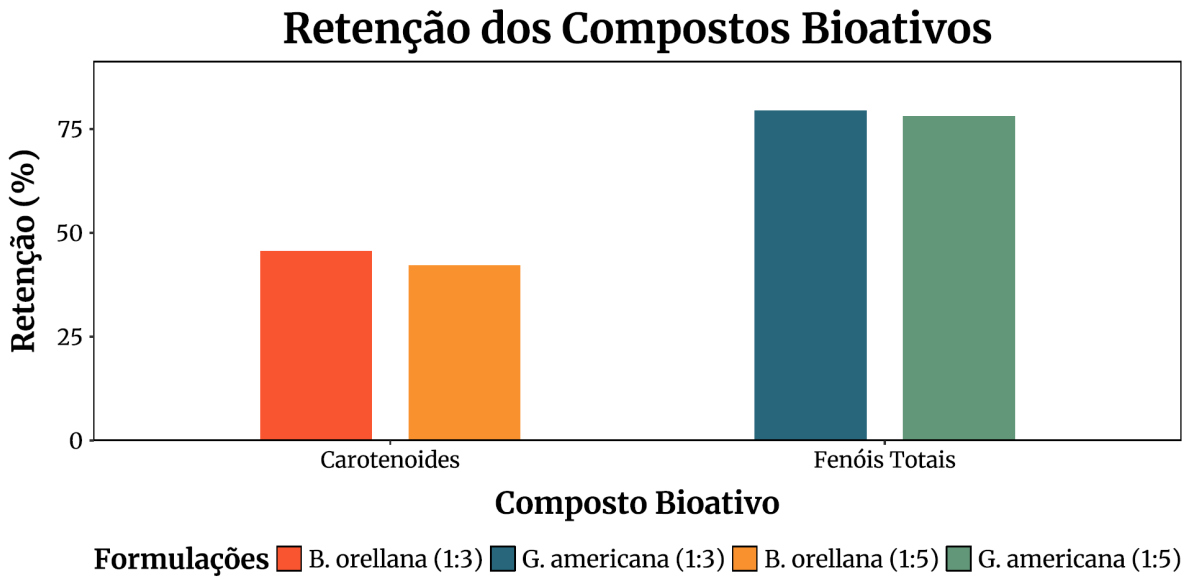


Figura 5.2 - Retenção de fenóis totais (TPC) e carotenoides (TCC) após encapsulação de extratos de *Bixa orellana* e *Genipa americana* em formulações 1:3 e 1:5. Os resultados representam os valores médios de retenção dos compostos bioativos obtidos para as diferentes formulações avaliadas.

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

A interpretação mais coerente para essa discrepância está na polaridade dos compostos. Compostos fenólicos são hidrofílicos e, portanto, apresentam compatibilidade estrutural com a maltodextrina e a goma arábica, ambas de natureza polar e com reconhecida capacidade de formar interações por pontes de hidrogênio com substratos aquosos [151, 152]. Essa afinidade química favorece o contenção física dos fenóis na matriz durante a solidificação do sistema, contribuindo para os elevados valores de retenção observados. Os carotenoides, por sua vez, são compostos apolares, lipofílicos, e apresentam baixa miscibilidade com matrizes aquosas à base de polissacarídeos. Nesse tipo de sistema sem fase lipídica, a interação entre carotenoides e carreadores é intrinsecamente limitada, o que predispõe à separação de fases, menor homogeneidade do encapsulado e, consequentemente, maior exposição dos compostos às condições do processo [149]. Some-se a isso a elevada suscetibilidade dos carotenoides à degradação oxidativa, que pode ser acelerada durante a etapa de homogeneização e, em menor grau, na liofilização, dada a exposição à interface ar-água e à luz durante o processamento [150].

A variação entre as proporções extrato:carreador foi, em ambos os casos, pequena. Para os fenóis totais, a diferença entre 1:3 e 1:5 foi de apenas 1,35 pontos percentuais; para

os carotenoides, 3,46 pontos percentuais. Em função da escassez de insumos disponíveis para o processamento, não foi possível obter replicatas experimentais para as formulações encapsuladas, o que limita a análise ao nível descritivo e impede a aplicação de testes de significância estatística. Dessa forma, não é possível afirmar que as diferenças numéricas observadas entre as proporções refletem um efeito real da formulação sobre a retenção. O que os dados permitem indicar, de forma descritiva, é que a alteração da proporção extrato:carreador no intervalo testado não produziu impacto expressivo sobre a retenção em nenhuma das duas matrizes, sugerindo que a limitação está na natureza do sistema encapsulante e não no ajuste da razão de diluição.

O rendimento de secagem foi moderado e relativamente homogêneo entre as formulações (figura 5.3). Os valores calculados foram 50,17% (*Bixa orellana* 1:3), 48,44% (*Bixa orellana* 1:5), 46,98% (*Genipa americana* 1:5) e 45,40% (*Genipa americana* 1:3), todos dentro da faixa de 45–51%. Esse nível de recuperação de massa é compatível com o relatado em estudos de liofilização de sistemas à base de maltodextrina e goma arábica, nos quais rendimentos entre 40% e 70% são frequentemente reportados, dependendo do teor de sólidos da dispersão inicial e das condições do ciclo de secagem [153, 154].

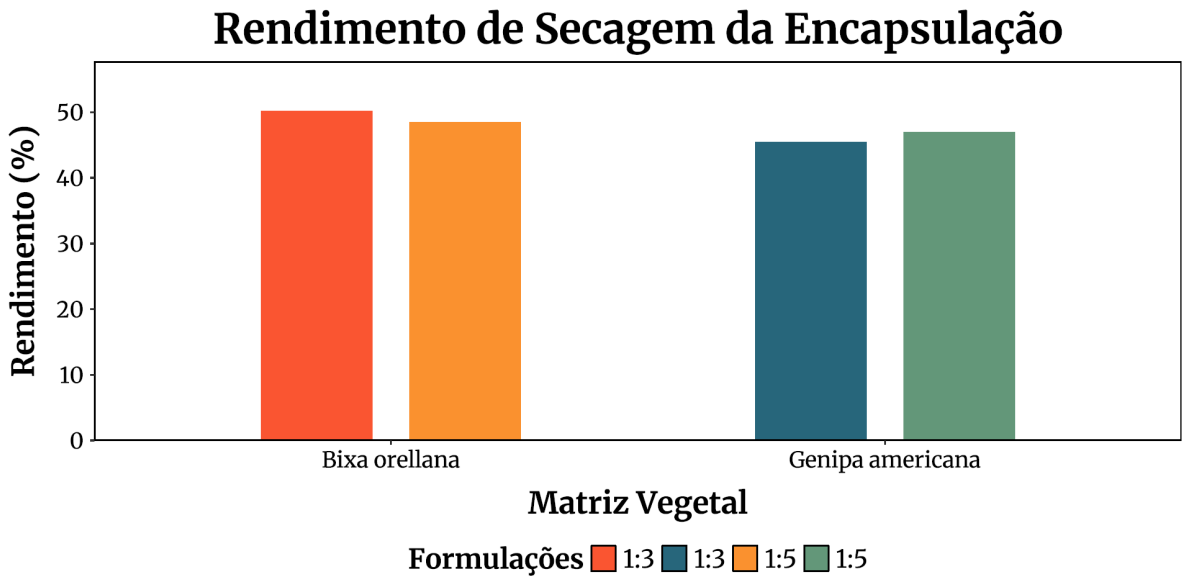


Figura 5.3 - Rendimento de secagem das formulações encapsuladas de extratos de *Bixa orellana* e *Genipa americana* nas proporções 1:3 e 1:5. Os resultados representam os valores de rendimento de secagem obtidos para as diferentes formulações e matrizes vegetais avaliadas.

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Os rendimentos obtidos foram próximos entre todas as formulações, variando de

45,40% a 50,17%, sem distinção expressiva entre as proporções testadas nem entre as duas matrizes. Esse comportamento sugere que, no intervalo de sólidos totais avaliado (40–42%), a variação na proporção extrato:carreador não foi determinante para a recuperação de massa após a liofilização. Mais relevante do que a comparação entre proporções, porém, é o que esse dado implica sobre a natureza das perdas observadas nas formulações de urucum - como o rendimento de secagem foi semelhante entre os dois extratos, a menor retenção de carotenoides não pode ser atribuída a perdas de massa durante o processo, mas aponta para limitações anteriores à solidificação — seja na incorporação dos compostos apolares à matriz aquosa, seja em degradação ocorrida durante a etapa de homogeneização.

Os resultados são coerentes com a literatura para encapsulação de compostos fenólicos em matrizes de maltodextrina e goma arábica por liofilização. Todorovic e colaboradores [151], ao encapsularem extrato de mirtilo, relataram retenção de fenóis totais entre 70% e 85% com formulações semelhantes, valores comparáveis aos encontrados neste estudo para *G. americana*. Ballesteros e colaboradores em 2017 [152] observaram retenção de compostos fenólicos entre 58% e 86% em extratos de café encapsulados por liofilização, reforçando que a elevada compatibilidade entre fenóis e matrizes polissacarídicas favorece a preservação desses compostos.

Para carotenoides, o panorama é diferente. Destaca-se que a encapsulação de β-caroteno por liofilização em matrizes sem fase lipídica resulta em maior instabilidade do composto durante e após o processo, com retenção variável e frequentemente inferior à de compostos polares [149]. Reforça-se também reforçam que a proteção de compostos apolares em sistemas à base de maltodextrina e goma arábica é limitada pela ausência de uma fase lipídica contínua que acomode adequadamente o núcleo apolar, sendo recomendada a adição de emulsificantes ou lipídios para esse tipo de encapsulado [150].

Em síntese, o processo de encapsulação por liofilização demonstrou desempenho diferenciado entre os compostos avaliados. Para os fenóis totais de *G. americana*, o processo apresentou desempenho moderado a elevado, com retenção próxima a 79% em ambas as formulações, resultado compatível com a natureza hidrofílica desses compostos e sua afinidade com a matriz utilizada. Para os carotenoides de *B. orellana*, o desempenho foi baixo a moderado, com retenção entre 42% e 46%, refletindo a incompatibilidade

intrínseca entre compostos apolares e uma matriz carreadora de natureza hidrofílica, sem fase lipídica. O rendimento de secagem foi moderado e homogêneo entre as formulações (∼45–50%), indicando que as perdas de compostos bioativos nas formulações de urucum não são atribuíveis a perdas de massa no processo de secagem, mas a fatores relacionados à incorporação e à estabilidade dos carotenoides no sistema encapsulante.

5.4.2 Digestibilidade in vitro

A avaliação do comportamento dos compostos bioativos ao longo da digestão simulada foi realizada para o extrato encapsulado de duas matrizes vegetais com características químicas distintas — *Bixa orellana*, representada pelo teor de carotenoides totais (TCC), e *Genipa americana*, avaliada pelo teor de fenóis totais (TPC) —, em duas proporções extrato:carreador (1:3 e 1:5), ao longo das fases oral, gástrica e intestinal. A análise considera, de forma complementar, o perfil de digestibilidade por fase e o perfil temporal de liberação, uma vez que os dois experimentos capturam dimensões distintas do mesmo processo, a digestibilidade fornece uma visão consolidada do comportamento em cada compartimento, enquanto o perfil temporal revela a dinâmica interna de cada fase.

É relevante considerar, desde o início, que o comportamento ao longo da digestão deve ser lido em continuidade com os resultados da etapa de encapsulação, embora a diferença de retenção entre as proporções 1:3 e 1:5 tenha sido pequena em ambas as matrizes, o comportamento diferencial observado ao longo da digestão sugere que a proporção extrato:carreador influencia a organização estrutural da matriz encapsulante de formas que não se manifestam necessariamente na retenção pós-encapsulação, mas que se tornam relevantes sob as condições de pH e ação enzimática da digestão simulada.

Ao longo desta seção, as formulações encapsuladas são referenciadas de forma abreviada para facilitar a leitura. As siglas BOE 1:3 e BOE 1:5 correspondem, respectivamente, ao extrato de *Bixa orellana* encapsulado nas proporções extrato:carreador 1:3 e 1:5. De forma análoga, GAE 1:3 e GAE 1:5 referem-se ao extrato de *Genipa americana* encapsulado nas mesmas proporções.

A *Bixa orellana* tem nos carotenoides — predominantemente bixina e norbixina — seus principais compostos bioativos. Diferentemente de carotenoides como o β-caroteno, a bixina e a norbixina são apocarotenoides com grupos carboxílicos que conferem relativa

polaridade em comparação a outros carotenoides, favorecendo uma solubilização inicial em fluidos aquosos. Contudo, ambos os compostos são reconhecidamente instáveis em pH ácido e suscetíveis à isomerização de formas all-trans para cis e à degradação oxidativa progressiva em condições gastrointestinais [149]. A encapsulação por liofilização em matriz de maltodextrina e goma arábica resultou em retenção de 45,56% para *B. orellana* 1:3 e 42,09% para *B. orellana* 1:5 — valores já indicativos da incompatibilidade intrínseca entre compostos apolares e uma matriz carreadora de natureza hidrofílica sem fase lipídica. Esses valores de partida condicionam a interpretação dos perfis de digestibilidade e liberação discutidos.

Na fase oral (SSF, t = 2 min), os valores de TCC (figura 5.4 e tabela 5.1) foram de 48,6 µg/mg para BOE 1:3 e 57,1 µg/mg para BOE 1:5, com diferença estatisticamente sustentada entre as proporções já nesse ponto inicial. Considerando que a α-amilase presente no fluido salivar não atua sobre carotenoides, essa diferença reflete, com maior probabilidade, a fração de compostos imediatamente solúvel no fluido aquoso — incluindo carotenoides depositados na superfície das partículas liofilizadas e aqueles em regiões mais acessíveis da matriz. O valor oral superior de BOE 1:5 é coerente com sua menor concentração de extrato por unidade de carreador - com menos bioativos a distribuir ao longo da matriz, uma proporção maior tende a permanecer nas regiões superficiais das partículas, tornando-se imediatamente disponível para solubilização. Esse comportamento inicial já antecipa o padrão que se desdobrará nas fases seguintes.

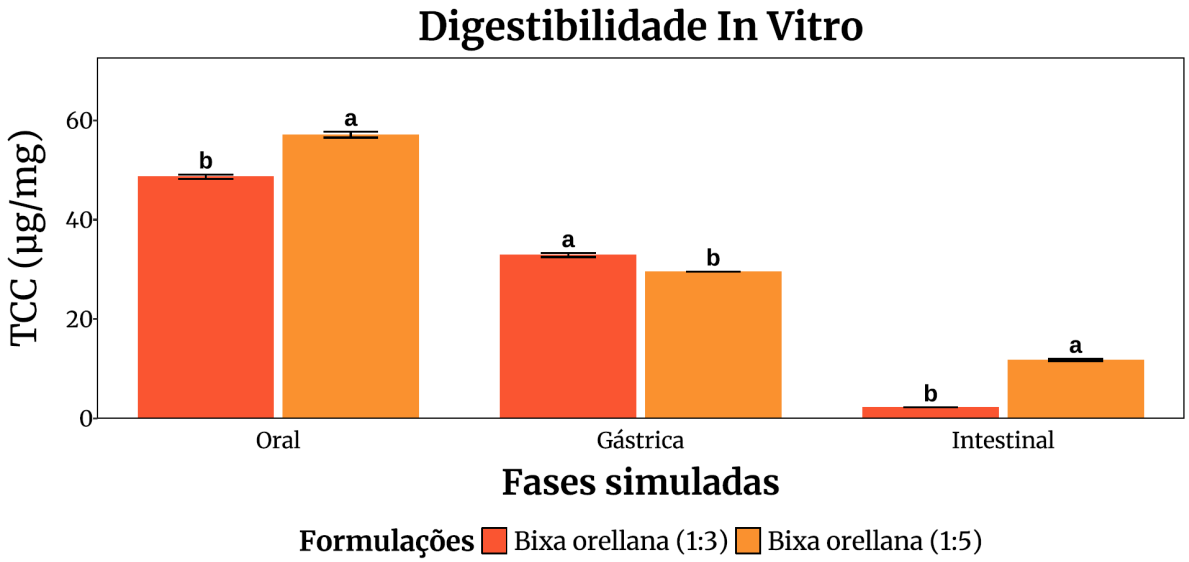


Figura 5.4 - Conteúdo de carotenoides totais (TCC) em extratos encapsulados de *Bixa orellana* nas formulações 1:3 e 1:5 ao longo das fases simuladas da digestão in vitro (oral, gástrica e intestinal).

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Na fase gástrica, ambas as formulações sofreram perdas expressivas, confirmando a vulnerabilidade dos carotenoides ao ambiente ácido-enzimático. Em termos de valores médios por fase, BOE 1:3 apresentou redução de 48,6 para 32,9 µg/mg, enquanto BOE 1:5 reduziu de 57,1 para 29,5 µg/mg — resultado estatisticamente diferente entre as proporções. Esse padrão indica que, apesar de BOE 1:5 partir de valor oral mais alto, sua redução proporcional na fase gástrica foi mais acentuada do que a de BOE 1:3. Uma possível explicação está na organização estrutural da matriz - em BOE 1:3, a maior concentração de extrato por unidade de carreador pode ter favorecido interações mais densas entre os carotenoides e os componentes da matriz durante a liofilização, resultando em uma estrutura encapsulante com maior resistência à desintegração gástrica. Essa hipótese, embora não diretamente sustentada por dados morfológicos, é coerente com o padrão observado e com a literatura que associa maior carga de bioativos a maior densidade de interações matriz-núcleo em sistemas encapsulados por liofilização [153].

Tabela 5.1 - Conteúdo de carotenoides totais (TCC) nas fases da digestão in vitro

Formulação	Fase	Média (μg/mg) ± SD
1:3	Oral	$48{,}644 \pm 0{,}770^{b}$
1:5	Oral	$57{,}089 \pm 1{,}018^{a}$
1:3	Gástrica	$32{,}867 \pm 0{,}6667^{a}$
1:5	Gástrica	$29{,}533 \pm 0{,}001^{b}$
1:3	Intestinal	$2{,}200 \pm 0{,}001^{b}$
1:5	Intestinal	$11{,}756 \pm 0{,}385^{a}$

Valores representam média ± desvio padrão. Diferenças significativas entre as formulações foram avaliadas separadamente para cada fase da digestão in vitro por ANOVA, seguida do teste de Tukey ($p < 0{,}05$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as formulações dentro de cada fase.

Na fase intestinal, os valores de TCC caíram para níveis muito próximos ao limite de detecção do método em ambas as formulações — BOE 1:3 atingiu ∼2,2 µg/mg, enquanto BOE 1:5 apresentou recuperação parcial para ∼11,8 µg/mg em t = 240 min, sem suporte estatístico viável nessa fase em razão de dados insuficientes, o que é por si só indicativo da severidade das perdas.

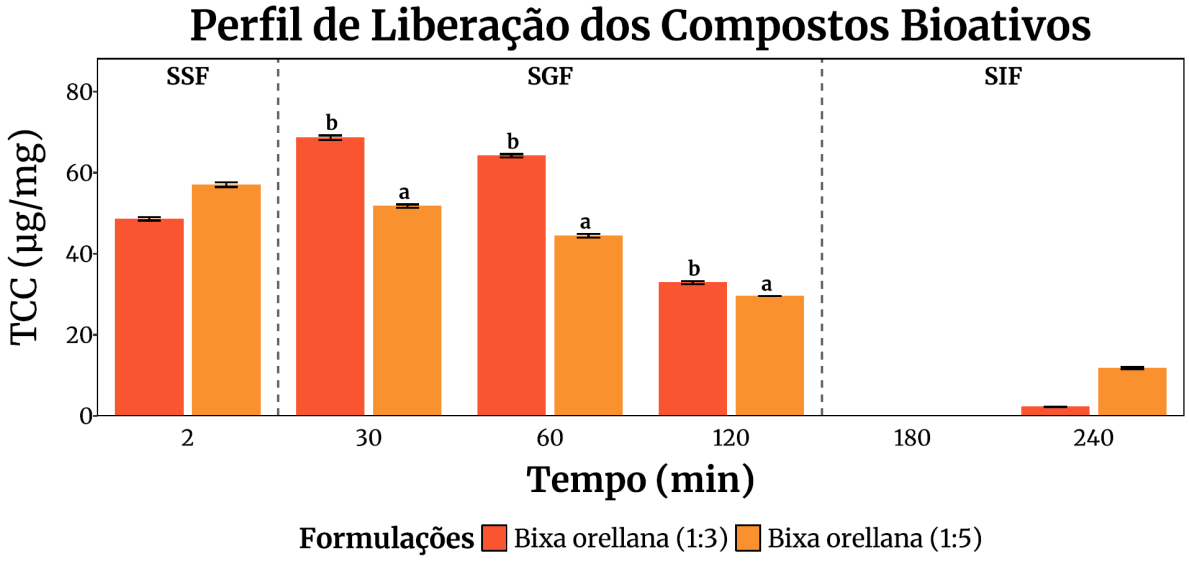


Figura 5.5 - Perfil de conteúdo de carotenoides totais (TCC) em função do tempo ao longo das fases simuladas da digestão in vitro em extratos encapsulados de *Bixa orellana* nas formulações 1:3 e 1:5.

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

A análise temporal (figura 5.5 e tabela 5.2) permite detalhar a dinâmica interna das fases e complementar a interpretação dos valores médios. No SSF (t = 2 min), os valores foram semelhantes aos da digestibilidade, confirmando consistência entre os dois

experimentos. Na fase gástrica simulada (SGF), BOE 1:3 apresentou aumento inicial de ∼49 µg/mg no SSF para ∼69 µg/mg em t = 30 min, antes de iniciar declínio progressivo até ∼34 µg/mg em t = 120 min. Esse aumento inicial é compatível com uma janela curta em que a liberação de carotenoides aprisionados na matriz interna supera a degradação — possivelmente facilitada pela exposição ao ambiente ácido e pela agitação mecânica contínua, que promovem a hidratação e o início da desintegração da matriz de maltodextrina. A relativa polaridade da bixina, decorrente de seus grupos carboxílicos, pode ter favorecido essa solubilização transitória antes que a degradação ácida se tornasse predominante. BOE 1:5, por sua vez, não apresentou esse aumento transitório — os valores seguiram de ∼57 µg/mg no SSF para ∼52 µg/mg em t = 30 min, com queda contínua até ∼30 µg/mg em t = 120 min. A ausência do pico inicial em BOE 1:5 indica que, com menor concentração de extrato, não houve o mesmo efeito de liberação concentrada, possivelmente porque os compostos já estavam mais expostos desde o início, sendo degradados à medida que eram liberados.

Tabela 5.2 - Perfil temporal de liberação de TCC.

Formulação	**Tempo**	**Fase**	**Média (μg/mg) ± SD**
1:3	2 min	Oral	48,644 ± 0,770
1:5	2 min	Oral	57,089 ± 1,018
1:3	30 min	Gástrica	$68{,}644 \pm 1{,}018^{b}$
1:5	30 min	Gástrica	$51{,}756 \pm 0{,}770^{a}$
1:3	60 min	Gástrica	$64{,}200 \pm 0{,}667^{b}$
1:5	60 min	Gástrica	$44{,}422 \pm 0{,}770^{a}$
1:3	120 min	Gástrica	$32{,}867 \pm 0{,}667^{b}$
1:5	120 min	Gástrica	$29{,}533 \pm 0{,}001^{a}$
1:3	180 min	Intestinal	ND
1:5	180 min	Intestinal	ND
1:3	240 min	Intestinal	2,200 ± 0,001
1:5	240 min	Intestinal	11,756 ± 0,385

Valores representam média ± desvio padrão. Diferenças significativas entre as formulações foram avaliadas, em cada fase e tempo da digestão in vitro, por ANOVA seguida do teste de Tukey ($p < 0{,}05$), com base em médias estimadas. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as formulações dentro de cada tempo avaliado. ND: não detectado (valores negativos, abaixo do limite de detecção do método).

Na fase intestinal simulada (SIF), os valores caíram progressivamente para próximo do limite de detecção em BOE 1:3, enquanto BOE 1:5 apresentou recuperação parcial apenas em t = 240 min. A inversão do padrão entre as proporções nesse ponto final — onde BOE 1:5 supera BOE 1:3 em t = 240 min — recebe uma hipótese estrutural.

Na formulação 1:5, a menor concentração de extrato por unidade de carreador pode ter favorecido a formação de complexos entre carotenoides e frações proteicas da goma arábica, potencialmente mais resistentes à degradação enzimática do que os carotenoides livres. A dissolução parcial desses complexos em pH 7,0 com ação de pancreatina poderia explicar a recuperação observada em t = 240 min. Essa hipótese não tem suporte direto nos dados disponíveis e requer investigação específica, mas é plausível levando em consideração a composição da matriz encapsulante utilizada.

A leitura integrada entre a digestibilidade por fase e o perfil temporal de liberação revela que os valores médios gástricos de BOE 1:3, superiores aos de BOE 1:5, não refletem proteção constante ao longo dos 120 min - o perfil temporal evidencia uma janela de liberação inicial seguida de degradação progressiva. Essa complementaridade entre os dois experimentos é metodologicamente relevante e impede que o valor médio gástrico, isoladamente, seja interpretado como evidência de proteção uniforme pela matriz encapsulante.

Se os carotenoides de *Bixa orellana* revelaram os limites do sistema encapsulante em proteger compostos lipofílicos ao longo da digestão simulada, os fenóis totais de *Genipa americana* permitem avaliar o comportamento do mesmo sistema frente a compostos com características físico-químicas opostas. Os fenóis de *Genipa americana* — predominantemente genipina e derivados iridoides — apresentam caráter hidrofílico, o que é compatível com a natureza polar da matriz de maltodextrina e goma arábica. Essa afinidade química se refletiu diretamente na etapa de encapsulação, com retenção de 79,42% para GAE 1:3 e 78,07% para GAE 1:5 — valores substancialmente superiores aos observados para os carotenoides, e que estabelecem condições de partida mais favoráveis para o comportamento ao longo da digestão. A diferença entre as proporções foi numericamente pequena e sem suporte estatístico, o que indica que, na etapa de encapsulação, a proporção extrato:carreador não foi um fator determinante para a retenção dos fenóis. No entanto, essa proporção revelou impacto mais evidente nas fases da digestão simulada.

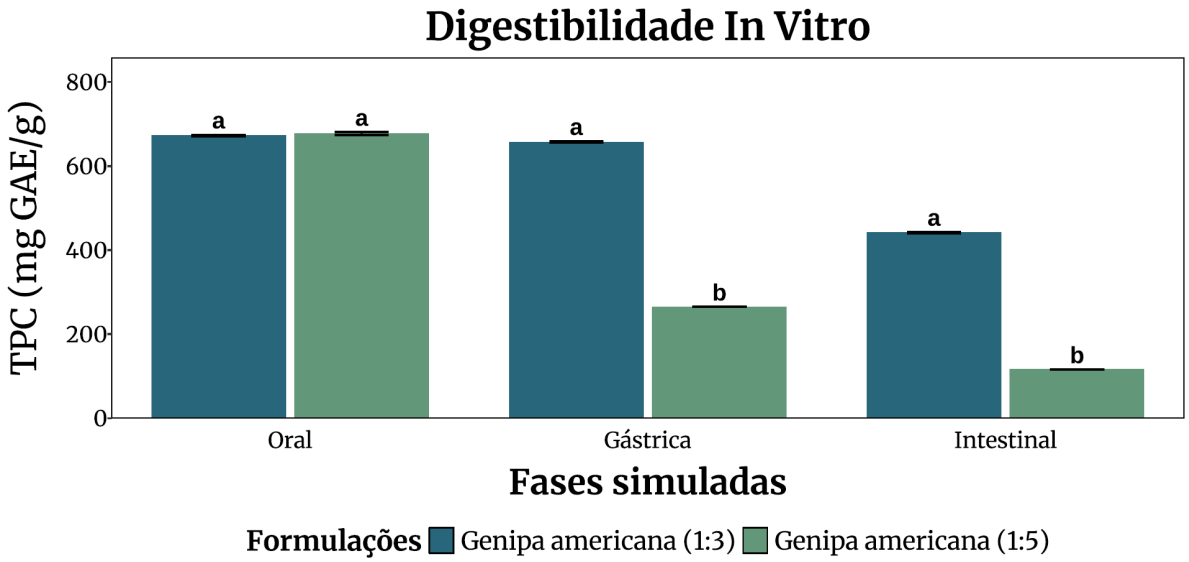


Figura 5.6 - Conteúdo de fenóis totais (TPC) em extratos encapsulados de *Genipa americana* nas formulações 1:3 e 1:5 ao longo das fases simuladas da digestão in vitro (oral, gástrica e intestinal).

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Na fase oral (SSF, t = 2 min), os valores de TPC (figura 5.6 e tabela 5.3) foram de 673 mg GAE/g para GAE 1:3 e 678 mg GAE/g para GAE 1:5, sem diferença estatisticamente sustentada entre as formulações. Ao contrário do observado para os carotenoides, a semelhança entre as proporções nessa fase inicial sugere que, para compostos hidrofílicos com alta compatibilidade com a matriz, a distribuição entre superfície e interior das partículas é menos sensível à variação da proporção extrato:carreador no intervalo testado — ou que a fração superficial é suficientemente pequena para não gerar diferença detectável pelo método utilizado. Esse ponto de partida equivalente torna ainda mais evidente o quanto o comportamento nas fases seguintes é determinado pelas condições do ambiente digestivo e pela capacidade protetora de cada formulação.

Tabela 5.3 - Conteúdo de fenóis totais (TPC) nas fases da digestão in vitro

Formulação	Fase	Média (mg GAE/g) ± SD
1:3	Oral	$672{,}954 \pm 3{,}454^{a}$
1:5	Oral	$677{,}552 \pm 6{,}606^{a}$
1:3	Gástrica	$657{,}437 \pm 3{,}589^{a}$
1:5	Gástrica	$265{,}023 \pm 0{,}718^{b}$
1:3	Intestinal	$441{,}690 \pm 3{,}065^{a}$
1:5	Intestinal	$116{,}172 \pm 0{,}345^{b}$

Valores representam média ± desvio padrão. Diferenças significativas entre as formulações foram avaliadas separadamente para cada fase da digestão in vitro por ANOVA, seguida do teste de Tukey ($p < 0{,}05$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as formulações dentro de cada fase.

Na fase gástrica, os perfis das duas proporções divergiram de forma marcante. Em termos de valores médios, GAE 1:3 reduziu de 673 para 657 mg GAE/g — variação de apenas ∼2,4%, sem diferença estatisticamente sustentada em relação ao valor oral. GAE 1:5, por sua vez, reduziu para 265 mg GAE/g, representando queda de aproximadamente 60,9% — diferença significativa em relação a GAE 1:3 e ao próprio valor oral. Essa divergência expressiva entre as proporções, que não havia sido detectada na etapa de encapsulação, sugere que a maior concentração de extrato em GAE 1:3 pode ter favorecido a formação de uma rede mais coesa entre os compostos fenólicos e os carreadores durante a liofilização.

Compostos fenólicos são conhecidos por sua capacidade de estabelecer pontes de hidrogênio com os grupos hidroxila da maltodextrina e interações hidrofóbicas com as frações proteicas da goma arábica, que possui caráter anfifílico decorrente de seu complexo arabinogalactana-proteína [151, 152]. Uma maior concentração de fenóis na matriz pode ter ampliado a densidade dessas interações, resultando em maior resistência à desintegração pelo ambiente ácido-enzimático. Na fase intestinal, GAE 1:3 apresentou recuperação parcial para 442 mg GAE/g, enquanto GAE 1:5 permaneceu em 116 mg GAE/g, mantendo a diferença entre as proporções estatisticamente sustentada. A recuperação observada em GAE 1:3 é consistente com a desintegração da matriz em pH 7,0 facilitada pelas enzimas pancreáticas, liberando fenóis retidos no interior das partículas ao longo da fase gástrica.

A análise temporal (figura 5.7 e tabela 5.4) complementa e detalha o que os valores médios por fase não capturam completamente. No SSF (t = 2 min), os valores foram consistentes com os da digestibilidade para ambas as formulações, confirmando a coerên-

cia entre os dois experimentos. Na fase gástrica simulada (SGF), GAE 1:3 apresentou comportamento não monotônico, queda em t = 30 min (∼635 mg GAE/g), seguida de elevação em t = 60 min (∼720 mg GAE/g) e nova redução em t = 120 min (∼660 mg GAE/g). Esse padrão oscilatório pode ser interpretado como resultado de dois processos simultâneos e competitivos — liberação de compostos pelo rompimento progressivo da matriz e degradação parcial dos fenóis pelas condições ácidas. A elevação em t = 60 min sugere que a liberação foi predominante nesse intervalo, possivelmente associada à hidratação e ao início da desintegração da fração de maltodextrina da matriz, que é solúvel em água e sensível ao pH ácido. A goma arábica, por sua vez, forma camadas mais resistentes à hidrólise ácida em razão de sua estrutura ramificada e de seu caráter anfifílico, o que pode ter retardado a degradação da barreira externa das partículas e sustentado os valores de TPC por mais tempo [154]. Para GAE 1:5, a queda foi contínua desde t = 30 min (∼500 mg GAE/g) até t = 120 min (∼265 mg GAE/g), sem oscilações, indicando que a menor concentração de extrato na matriz não foi suficiente para gerar o mesmo padrão de liberação-degradação competitiva observado em GAE 1:3.

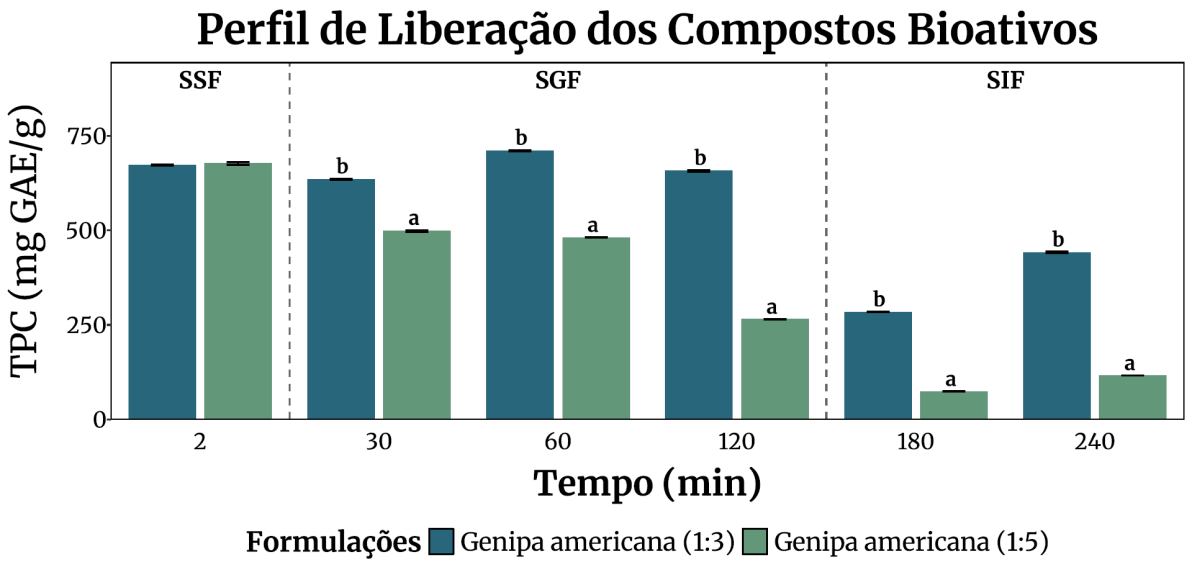


Figura 5.7 - Perfil de conteúdo de fenóis totais (TPC) em função do tempo ao longo das fases simuladas da digestão in vitro em extratos encapsulados de *Genipa americana* nas formulações 1:3 e 1:5.

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Na fase intestinal simulada (SIF), GAE 1:3 apresentou aumento progressivo de ∼300 mg GAE/g em t = 180 min para ∼430 mg GAE/g em t = 240 min, padrão compatível com a liberação de compostos fenólicos ainda retidos no interior das partículas à

medida que a matriz se desintegra em pH neutro com ação enzimática pancreática. Adicionalmente, a hidrólise de ésteres fenólicos pela pancreatina pode gerar ácidos fenólicos livres detectáveis pelo reagente de Folin-Ciocalteu, contribuindo para o aumento observado — embora esse processo represente transformação química e não necessariamente maior disponibilidade das formas originais. GAE 1:5, em contraste, permaneceu em níveis baixos ao longo de toda a fase intestinal, sem recuperação expressiva, reforçando que a degradação majoritária na fase gástrica comprometeu a disponibilidade de compostos para a fase subsequente.

A leitura integrada entre os dois experimentos revela que o valor médio gástrico de GAE 1:3, próximo ao valor oral, não deve ser interpretado como evidência de proteção estática - o perfil temporal evidencia processos dinâmicos de liberação e degradação que se alternam ao longo dos 120 min. Da mesma forma, a recuperação observada na fase intestinal não seria identificável a partir dos valores médios por fase de GAE 1:5, que permaneceu baixo e sem recuperação em qualquer ponto temporal. Essa complementaridade entre digestibilidade e perfil de liberação é, portanto, indispensável para uma caracterização funcional mais precisa dos sistemas encapsulados.

Tabela 5.4 - Perfil temporal de liberação de TPC.

Formulação	**Tempo**	**Fase**	**Média (mg GAE/g) ± SD**
1:3	2 min	Oral	672,954 ± 3,454
1:5	2 min	Oral	677,552 ± 6,606
1:3	30 min	Gástrica	$635{,}598 \pm 2{,}296^{b}$
1:5	30 min	Gástrica	$498{,}241 \pm 4{,}237^{a}$
1:3	60 min	Gástrica	$711{,}000 \pm 2{,}823^{b}$
1:5	60 min	Gástrica	$481{,}345 \pm 1{,}195^{a}$
1:3	120 min	Gástrica	$657{,}437 \pm 3{,}589^{b}$
1:5	120 min	Gástrica	$265{,}023 \pm 0{,}718^{a}$
1:3	180 min	Intestinal	$284{,}218 \pm 1{,}394^{b}$
1:5	180 min	Intestinal	$74{,}218 \pm 0{,}199^{a}$
1:3	240 min	Intestinal	$441{,}690 \pm 3{,}065^{b}$
1:5	240 min	Intestinal	$116{,}172 \pm 0{,}345^{a}$

Valores representam média ± desvio padrão. Diferenças significativas entre as formulações foram avaliadas, em cada fase e tempo da digestão in vitro, por ANOVA seguida do teste de Tukey ($p < 0{,}05$), com base em médias estimadas. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as formulações dentro de cada tempo avaliado.

A comparação entre os perfis de *Bixa orellana* e *Genipa americana* ao longo da digestão simulada confirma que a natureza química dos compostos encapsulados é o principal

fator determinante do comportamento digestivo, sobrepondo-se ao efeito da proporção extrato:carreador. Os fenóis hidrofílicos de *Genipa americana* responderam de forma mais favorável ao sistema empregado, com proteção gástrica efetiva e recuperação intestinal parcial para a formulação 1:3 — comportamento coerente com a elevada retenção (∼79%) observada na etapa de encapsulação e com a afinidade química entre fenóis e a matriz polissacarídica utilizada.

Os carotenoides lipofílicos de *Bixa orellana*, por sua vez, mostraram-se mais vulneráveis às condições do trato gastrointestinal simulado, com perdas severas em todas as fases — resultado igualmente coerente com a menor retenção (∼43–46%) obtida na encapsulação, reflexo da incompatibilidade intrínseca entre compostos apolares e uma matriz carreadora sem fase lipídica. Esse contraste entre as matrizes não implica que o sistema encapsulante seja ineficaz para carotenoides em termos absolutos, mas sim que as condições experimentais adotadas — especificamente a ausência de fase lipídica no protocolo INFOGEST — não reproduzem adequadamente o ambiente fisiológico necessário para a solubilização e micelização de compostos apolares. Estudos com sistemas encapsulantes enriquecidos com lipídeos demonstraram aumentos expressivos na recuperação de carotenoides ao longo da digestão simulada, reforçando que a incorporação de uma fase lipídica representa não apenas uma adaptação metodológica, mas uma condição funcional para avaliar compostos dessa natureza [149, 155].

Em relação à influência da proporção extrato:carreador, o padrão observado foi consistente entre as duas matrizes - a formulação 1:3, com maior concentração de extrato por unidade de carreador, apresentou maior proteção gástrica e maior recuperação intestinal em ambos os casos. Esse resultado é, à primeira vista, contra-intuitivo, uma vez que a formulação 1:5 dispõe de mais carreador por unidade de extrato — o que poderia ser esperado como fator de maior proteção. Uma possível explicação está na organização estrutural da matriz durante a liofilização - em 1:3, a maior quantidade de bioativos por unidade de carreador pode ter favorecido uma distribuição mais homogênea e interações mais densas entre compostos e matriz, resultando em uma estrutura encapsulante mais coesa e resistente às condições digestivas. Em 1:5, a menor concentração de extrato pode ter gerado uma matriz com maior porosidade ou menor densidade de interações bioativo-carreador, tornando os compostos mais suscetíveis à exposição aos fluidos digestivos. Essa

hipótese é coerente com estudos que associam maior carga de compostos fenólicos a estruturas encapsulantes mais compactas em sistemas liofilizados [151,152], embora a ausência de dados morfológicos diretos no presente estudo impeça uma conclusão definitiva sobre o mecanismo envolvido.

5.4.3 Atividade Antioxidante como Indicador Funcional

A análise da atividade antioxidante ao longo das fases oral, gástrica e intestinal revelou padrões distintos entre os ensaios DPPH e ABTS — e essa divergência, por si só, é um resultado interpretativo relevante. O DPPH não detectou atividade antioxidante mensurável em nenhuma das condições avaliadas - todas as formulações, em todas as fases e tempos de coleta, produziram valores abaixo do limite de detecção do método. O ensaio ABTS apresentou comportamento diferente, nas fases oral e gástrica, os valores também permaneceram negativos na maioria das condições, mas na fase intestinal houve uma transição expressiva, com três das quatro formulações atingindo atividade positiva e distinguível — BOE 1:5 foi a que apresentou maior resposta, seguida de BOE 1:3 e GAE 1:3, enquanto GAE 1:5 permaneceu abaixo do limiar de detecção mesmo nessa fase. Esses dois ensaios operam por mecanismos distintos e respondem de forma diferente à composição da matriz; por isso, era esperado que não produzissem resultados coincidentes ao longo do processo digestivo.

A ausência de resposta no ensaio DPPH não é um resultado descartável — é uma evidencia consistente que necessita interpretação. O DPPH é um radical lipossolúvel que reage preferencialmente com compostos fenólicos de baixo peso molecular por transferência de hidrogênio em meio apolar ou levemente polar. As matrizes estudadas trazem compostos com perfis químicos que não favorecem essa reatividade nas condições aquosas impostas pela digestão simulada - o extrato de *Bixa orellana* é rico em bixina, um carotenoide apolar de cadeia longa, enquanto o de *Genipa americana* contém iridoides glicosilados e compostos azulenos resultantes de reações de condensação com grupos amino. Em meio aquoso, a reatividade desses compostos com o DPPH é naturalmente reduzida, independentemente da concentração presente na amostra.

Além disso, os fluidos digestivos simulados — especialmente o gástrico (pH 3,0) e o intestinal (pH 7,0), com suas enzimas e sais biliares — introduzem uma matriz química

complexa que pode competir por radicais, interferir na absorbância medida em 515–520 nm ou alterar a solubilidade dos compostos ativos. A maltodextrina e a goma arábica também podem formar estruturas que dificultam a difusão dos compostos até o sítio de reação. Esses fatores combinados tornam o DPPH metodologicamente inadequado para esse tipo de matriz pós-digestão — o que é reconhecido na literatura como uma limitação inerente ao ensaio em amostras complexas e aquosas [123, 165]. Os resultados negativos, portanto, indicam que o método atingiu seu limite de aplicabilidade, e não que os extratos sejam desprovidos de compostos com potencial antioxidante. Estudos com sistemas encapsulados em maltodextrina e goma arábica submetidos à digestão in vitro também registraram ausência ou instabilidade da resposta DPPH, atribuindo esse comportamento à interferência da matriz encapsulante e às transformações estruturais dos compostos ao longo do processo digestivo [147, 155].

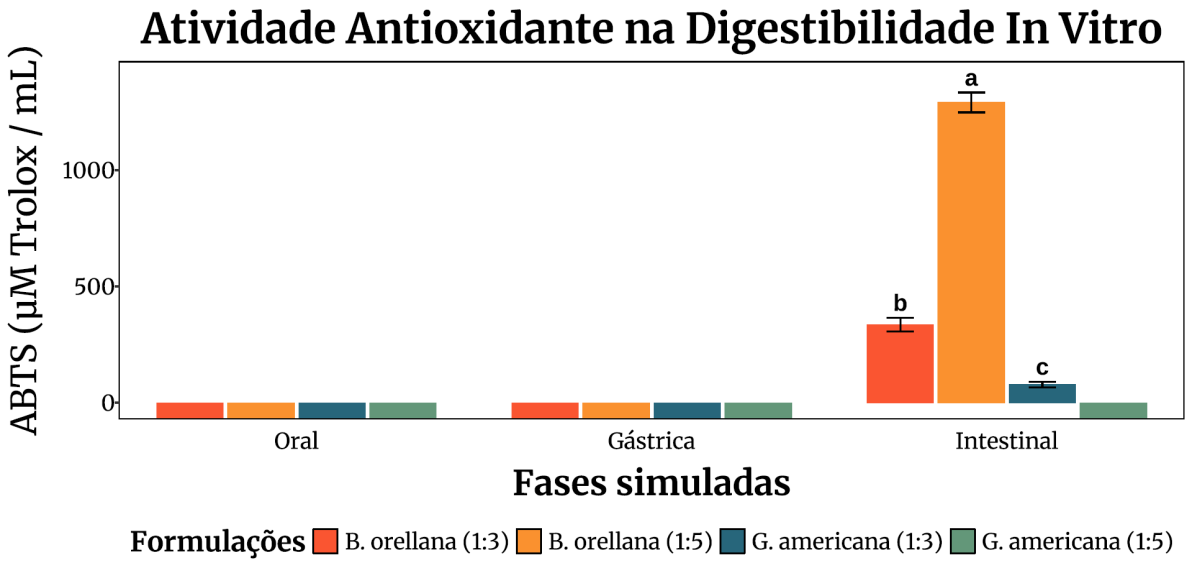


Figura 5.8 - Atividade antioxidante ABTS de extratos encapsulados de *Bixa orellana* e *Genipa americana* nas formulações 1:3 e 1:5 após as fases simuladas da digestão in vitro (oral, gástrica e intestinal)

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

O ensaio ABTS capturou o que o DPPH não conseguiu detectar, e o padrão observado (figura 5.8 e tabela 5.5) é funcionalmente significativo. Nas fases oral e gástrica, a maioria das formulações permaneceu abaixo do limiar de detecção, com exceção da BOE 1:3, que apresentou o valor menos negativo já na fase oral — possivelmente reflexo de alguma reatividade residual em pH próximo à neutralidade, como o salivar. A mudança mais relevante ocorreu na fase intestinal, três formulações passaram a apresentar atividade

positiva, e esse comportamento não parece ser resultado de variação aleatória, mas de um processo dependente das condições do ambiente intestinal.

Tabela 5.5 - Atividade antioxidante ABTS nas fases da digestão in vitro

Formulação	Fase	Média (μM Trolox/ml) ± SD
BOE 1:3	Oral	ND
GAE 1:3	Oral	ND
BOE 1:5	Oral	ND
GAE 1:5	Oral	ND
BOE 1:3	Gástrica	ND
GAE 1:3	Gástrica	ND
BOE 1:5	Gástrica	ND
GAE 1:5	Gástrica	ND
BOE 1:3	Intestinal	$335{,}444 \pm 51{,}244^{b}$
GAE 1:3	Intestinal	$78{,}5 \pm 20{,}833^{c}$
BOE 1:5	Intestinal	$1291 \pm 73{,}333^{a}$
GAE 1:5	Intestinal	ND

Valores representam média ± desvio padrão. Diferenças significativas entre as formulações foram avaliadas separadamente para cada fase da digestão in vitro por ANOVA, seguida do teste de Tukey ($p < 0{,}05$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as formulações dentro de cada fase avaliada. ND: não detectado (valores negativos, abaixo do limite de detecção do método).

O ABTS$^{\bullet+}$ é um radical hidrofílico que reage tanto por transferência de hidrogênio quanto por transferência de elétrons, tornando-o mais sensível a compostos antioxidantes em meio aquoso — o que explica, em parte, por que esse ensaio detectou atividade onde o DPPH falhou [125]. Mas além da característica do ensaio, o que se está considerando é a liberação de compostos funcionalmente ativos especificamente na fase intestinal. A ação da pancreatina sobre os polissacarídeos da matriz encapsulante pode liberar compostos que estavam retidos ou inativos nas fases anteriores, e o pH neutro-alcalino favorece formas desprotonadas de fenólicos, que são mais reativas com o radical ABTS$^{\bullet+}$. Para *Genipa americana*, a presença de iridoides glicosilados — que requerem hidrólise para liberar a aglicona ativa — é coerente com o aumento de atividade observado apenas nessa fase. Esse padrão é convergente com o descrito por Martinović, Yeasmen e Orsat [147,148], que identificaram a fase intestinal como o principal ponto de expressão da atividade antioxidante em sistemas encapsulados com polissacarídeos, atribuindo o fenômeno à hidrólise enzimática tanto da parede quanto dos próprios compostos encapsulados.

A comparação entre as formulações revela um comportamento que varia conforme o sistema. Para BOE, a formulação 1:5 foi a que apresentou maior atividade antioxidante na

fase intestinal, superando a 1:3 de forma clara e consistente entre as réplicas. Isso sugere que a maior proporção de material encapsulante ofereceu proteção mais eficaz durante as fases iniciais da digestão, preservando os compostos para liberação funcional no ambiente intestinal. Essa interpretação é coerente com estudos que relataram maior proteção de compostos fenólicos em formulações com maior teor de carreadores durante a digestão gástrica simulada [150, 151].

Para GAE, o comportamento foi inverso, a formulação 1:5 permaneceu sem atividade detectável mesmo na fase intestinal, enquanto a 1:3 apresentou, ainda que modestamente, atividade positiva. Uma hipótese razoável é que a maior quantidade de maltodextrina na formulação 1:5 de GAE tenha criado uma barreira mais densa, que em vez de proteger os compostos para liberação posterior, limitou sua disponibilidade mesmo sob ação enzimática. O que os dados permitem afirmar com segurança é que a resposta à proporção de encapsulante não é universal; ela depende da composição química do extrato, e o comportamento ótimo de uma formulação para BOE não se aplica necessariamente a GAE.

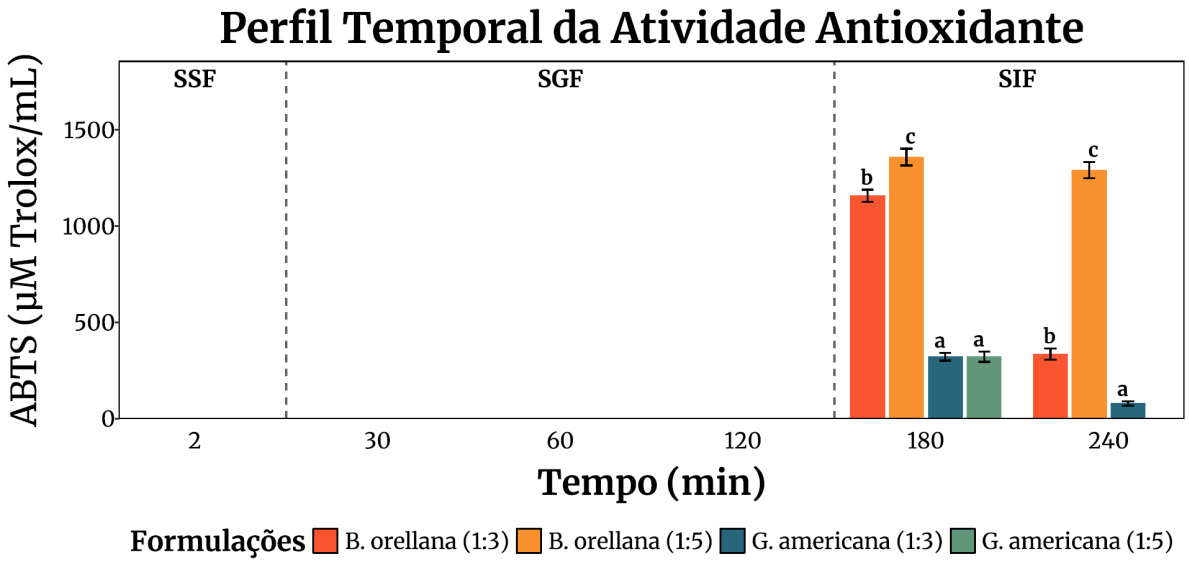


Figura 5.9 - Perfil temporal da atividade antioxidante ABTS de extratos encapsulados de *Bixa orellana* e *Genipa americana* nas formulações 1:3 e 1:5 ao longo das fases simuladas da digestão in vitro (oral, gástrica e intestinal).

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

O perfil temporal (figura 5.9 e tabela 5.6) revela um padrão que vai além da simples distinção entre fases, a ausência de atividade detectável é absoluta nas fases SSF e SGF

— nenhuma formulação, em nenhum dos tempos coletados (t = 2, 30, 60 e 120 min), produziu valores acima do limite de detecção do ensaio ABTS. Isso indica que o comportamento observado não é resultado de variação pontual, mas de uma condição sistemática associada ao ambiente químico dessas fases. O pH ácido do SGF (3,0), combinado à ação da pepsina e à estrutura ainda íntegra da matriz encapsulante, parece ser suficiente para manter os compostos retidos ou em condições que inibem sua reatividade com o radical $ABTS^{\bullet+}$. A encapsulação, nesse sentido, cumpre aqui um papel de barreira — não necessariamente preservando a atividade, mas impedindo sua atuação em um compartimento onde a absorção ainda não ocorreria de forma relevante.

A transição para a fase SIF não apenas marca o surgimento da atividade detectável, mas também revela uma dinâmica temporal internamente relevante - entre t = 180 min e t = 240 min, os valores se modificam de forma significativa, e esse comportamento não é homogêneo entre as formulações. A interação entre formulação e tempo dentro da SIF indica que cada sistema responde de forma distinta ao avanço da digestão intestinal — algumas formulações aumentam a atividade entre os dois tempos, outras a reduzem. Esse padrão sugere que a liberação dos compostos ativos não ocorre de uma única vez com a mudança de pH, mas de forma progressiva, provavelmente à medida que a pancreatina vai hidrolisando os polissacarídeos da parede encapsulante e os complexos entre compostos e carreadores vão se desfazendo. Estudos com sistemas encapsulados por liofilização com maltodextrina e goma arábica relataram perfil semelhante de liberação gradual na fase intestinal, com atividade antioxidante crescente ao longo do tempo de digestão intestinal, atribuída à degradação enzimática progressiva da matriz [147, 151].

Tabela 5.6 - Perfil temporal da atividade antioxidante ABTS.

Formulação	Tempo	Fase	Média (μM Trolox/ml
BOE 1:3	2 min	Oral	ND
GAE 1:3	2 min	Oral	ND
BOE 1:5	2 min	Oral	ND
GAE 1:5	2 min	Oral	ND
BOE 1:3	30 min	Gástrica	ND
GAE 1:3	30 min	Gástrica	ND
BOE 1:5	30 min	Gástrica	ND
GAE 1:5	30 min	Gástrica	ND
BOE 1:3	60 min	Gástrica	ND
GAE 1:3	60 min	Gástrica	ND
BOE 1:5	60 min	Gástrica	ND
GAE 1:5	60 min	Gástrica	ND
BOE 1:3	120 min	Gástrica	ND
GAE 1:3	120 min	Gástrica	ND
BOE 1:5	120 min	Gástrica	ND
GAE 1:5	120 min	Gástrica	ND
BOE 1:3	180 min	Intestinal	$1157{,}249 \pm 54{,}583^{b}$
GAE 1:3	180 min	Intestinal	$321 \pm 35{,}277^{a}$
BOE 1:5	180 min	Intestinal	$1358{,}499 \pm 75{,}833^{c}$
GAE 1:5	180 min	Intestinal	$321{,}111 \pm 46{,}667^{a}$
BOE 1:3	240 min	Intestinal	$335{,}444 \pm 51{,}244^{b}$
GAE 1:3	240 min	Intestinal	$78{,}5 \pm 20{,}833^{a}$
BOE 1:5	240 min	Intestinal	$1291 \pm 73{,}333^{c}$
GAE 1:5	240 min	Intestinal	ND

Valores representam média ± desvio padrão. Diferenças significativas entre as formulações foram avaliadas, em cada fase e tempo da digestão in vitro, por ANOVA seguida do teste de Tukey ($p < 0{,}05$), utilizando médias estimadas. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as formulações dentro de cada tempo. ND: não detectado (valores negativos, abaixo do limite de detecção do método).

BOE 1:5 e BOE 1:3 apresentaram os maiores valores na SIF, com BOE 1:5 se destacando ao longo dos dois tempos coletados. Isso é coerente com a hipótese de que maior proporção de carreador, ao formar uma matriz mais densa, retarda a liberação nas fases iniciais e concentra a disponibilidade dos compostos na fase intestinal — fase onde as condições favorecem tanto a hidrólise enzimática quanto a reatividade com o ABTS$\bullet^{+}$. GAE 1:3 apresentou atividade detectável na SIF, ainda que em níveis mais baixos, indicando que parte dos compostos de *Genipa americana* alcança o compartimento intestinal em forma funcionalmente ativa. GAE 1:5, por sua vez, permaneceu sem atividade detectável em todos os tempos e fases, sendo a única formulação excluída da análise estatística da SIF por ausência de valores válidos. Esse comportamento é o mais difícil de interpretar apenas

com os dados de atividade antioxidante - se a maior proporção de carreador protegeu os compostos durante a digestão gástrica, é esperado que eles estivessem disponíveis na fase intestinal — mas o ensaio não os detectou. Uma possibilidade é que a maior densidade da matriz de GAE 1:5 tenha limitado a hidrólise enzimática suficientemente a ponto de manter os compostos retidos mesmo ao final dos 240 min de digestão simulada. Outra hipótese é que os compostos liberados nessa formulação específica apresentem baixa reatividade com o ABTS$\bullet^{+}$ nas condições do ensaio, independentemente de sua concentração.

A atividade antioxidante dos extratos encapsulados de *Bixa orellana* e *Genipa americana* ao longo da digestão simulada pode ser considerada como parcialmente preservada, com expressão funcional restrita à fase intestinal e dependente do ensaio utilizado. O DPPH mostrou-se metodologicamente inadequado para essas matrizes nas condições pós-digestivas, e seus resultados negativos refletem uma limitação do método, não necessariamente dos compostos. O ABTS captou uma transição funcional real na fase intestinal, onde a ação enzimática e o pH favorável criaram condições para a expressão da atividade antioxidante — especialmente em BOE 1:5, que apresentou o melhor desempenho funcional entre as formulações avaliadas. GAE 1:5 foi a única a permanecer sem atividade detectável em todas as fases, o que distingue seu comportamento e aponta para uma interação específica entre a composição desse extrato e a proporção de encapsulante utilizada, que merece atenção em estudos futuros.

5.4.4 Visão Integrada das Análises

A encapsulação, a digestibilidade e a atividade antioxidante foram avaliadas em sequência porque cada uma responde a uma dimensão distinta — e complementar — da mesma pergunta: o sistema é capaz de proteger compostos bioativos, liberá-los no compartimento adequado e mantê-los funcionalmente ativos? Nenhuma dessas análises, isoladamente, responde a essa questão. A retenção pós-encapsulação define o quanto existe para ser liberado; o comportamento digestivo define quando e quanto é de fato liberado ao longo das fases gastrointestinais; e a atividade antioxidante define se o que foi liberado ainda exerce função relevante. É essa articulação entre as três dimensões que dá sentido ao conjunto e que orienta a interpretação integrada. O que os dados revelam, antes de qualquer outra consideração, é que o fator determinante do desempenho do

sistema não é a proporção extrato:carreador, nem a eficiência do processo de secagem — é a compatibilidade físico-química entre o composto encapsulado e a matriz utilizada. A diferença de aproximadamente 35 pontos percentuais na retenção entre os fenóis de *Genipa americana* (∼79%) e os carotenoides de *Bixa orellana* (∼43–46%) não é um dado pontual, ela condiciona toda a trajetória subsequente dos compostos ao longo da digestão simulada, amplificando o impacto das perdas nas fases seguintes e refletindo, de forma consistente, a incompatibilidade entre compostos apolares e uma matriz carreadora de natureza hidrofílica sem fase lipídica.

A relação entre retenção e perfil de liberação não é linear e comporta compensações importantes. Para *Genipa americana* na formulação 1:3, a alta retenção inicial se associou à proteção efetiva na fase gástrica e à recuperação parcial na fase intestinal — padrão que configura o comportamento mais próximo do desejável para um sistema de liberação direcionada. No entanto, o perfil temporal dessa mesma formulação revelou dinâmica oscilatória na fase gástrica, com processos de liberação e degradação ocorrendo simultaneamente, o que impede a interpretação da proteção gástrica como uniforme. Para *Bixa orellana*, o pico transitório de TCC observado no início da fase gástrica em BOE 1:3 ilustra outro tipo de compensação, a liberação ocorre, mas é rapidamente sobreposta pela degradação, de modo que o aumento momentâneo de compostos disponíveis não se traduz em proteção efetiva nem em recuperação intestinal mensurável. Esses dois padrões distintos demonstram que alta retenção não garante, por si só, melhor liberação intestinal — e que a relação entre proteção e disponibilidade é mediada pela estabilidade dos compostos nas condições específicas de cada fase digestiva, não apenas pela eficiência do encapsulamento.

A conexão entre perfil de liberação e atividade antioxidante trouxe um resultado que, à primeira vista, parece contradizer o padrão observado nas etapas anteriores. A formulação com menor retenção de carotenoides (BOE 1:5, 42%) e maior vulnerabilidade gástrica foi, paradoxalmente, a que apresentou maior atividade antioxidante ABTS na fase intestinal. Essa aparente contradição se dissolve quando se considera que a atividade funcional no ensaio ABTS é influenciada não apenas pelo teor bruto dos compostos originais, mas pela forma química em que se encontram no momento do ensaio — incluindo produtos de hidrólise parcial, formas desprotonadas em pH 7,0 e compostos liberados pela ação

enzimática sobre a matriz. A menor densidade de bioativos em BOE 1:5 pode ter gerado estrutura matricial mais permeável à hidrólise pancreática, favorecendo a liberação de formas reativas na fase intestinal. Esse comportamento não significa que menor retenção seja vantajosa em termos absolutos, mas indica que teor de compostos, liberação e funcionalidade são dimensões dissociáveis — e que tratá-las como equivalentes representa uma simplificação que compromete a interpretação. A ausência de resposta DPPH em todas as condições reforça esse ponto, não é evidência de ausência de compostos funcionais, mas de inadequação metodológica do ensaio para matrizes aquosas complexas pós-digestão, o que é consistente com o relatado na literatura para sistemas encapsulados em polissacarídeos submetidos à digestão in vitro.

A influência da proporção extrato:carreador, tornou-se evidente ao longo da digestão — e de sinal oposto entre as duas matrizes. Para *Genipa americana*, a formulação 1:3 apresentou melhor proteção gástrica e maior recuperação intestinal, sugerindo que a maior densidade de interações fenol-matriz forma estruturas encapsulantes mais resistentes às condições ácido-enzimáticas. Para *Bixa orellana*, BOE 1:5 exibiu maior atividade antioxidante intestinal, indicando que, nesse caso, a organização matricial com menor concentração de extrato favoreceu a liberação de formas funcionalmente ativas na fase intestinal, ainda que com menor recuperação de TCC. Essa divergência entre matrizes impede qualquer generalização sobre a proporção ótima e aponta para uma dependência específica de cada combinação composto-carreador. As relações aqui estabelecidas descrevem padrões de comportamento em sistemas experimentais e não devem ser projetadas diretamente para contextos fisiológicos reais sem investigação complementar.

Em conjunto, os resultados das três etapas caracterizam um sistema com desempenho funcional diferenciado conforme a natureza dos compostos encapsulados. A matriz de maltodextrina e goma arábica demonstrou ser adequada para compostos hidrofílicos — oferecendo proteção gástrica efetiva e recuperação intestinal parcial para os fenóis de *Genipa americana* na formulação 1:3 — e insuficiente, nas condições testadas, para compostos lipofílicos, cuja proteção e recuperação foram limitadas pela ausência de fase lipídica. A expressão da atividade antioxidante restrita à fase intestinal, captada pelo ABTS, é coerente com o perfil de liberação esperado para sistemas à base de polissacarídeos e confirma que a funcionalidade dos compostos emerge no compartimento onde as

condições de pH e ação enzimática favorecem simultaneamente a desintegração da matriz e a reatividade dos compostos liberados. Esse conjunto de evidências posiciona o sistema como tecnologicamente viável para compostos fenólicos hidrofílicos em aplicações onde proteção gástrica e liberação intestinal são desejáveis, e indica a incorporação de fase lipídica como caminho necessário para ampliar o desempenho com compostos apolares.

5.5 Conclusões

A encapsulação por liofilização com maltodextrina e goma arábica produziu desempenho diferenciado entre os compostos avaliados, determinado principalmente pela compatibilidade físico-química entre o bioativo e a matriz carreadora. A alta retenção dos fenóis de *Genipa americana* decorreu da afinidade entre compostos hidrofílicos e uma matriz de natureza polar, enquanto a retenção moderada dos carotenoides de *Bixa orellana* refletiu a incompatibilidade intrínseca entre compostos apolares e um sistema encapsulante sem fase lipídica. O rendimento de secagem homogêneo entre as formulações confirmou que essa diferença não é atribuível ao processo de secagem, mas à etapa de incorporação. A proporção extrato:carreador não exerceu efeito expressivo sobre a retenção em nenhuma das matrizes, indicando que o fator limitante é estrutural, não de formulação.

A digestibilidade in vitro confirmou e amplificou esse padrão. Para *Genipa americana*, a formulação 1:3 apresentou proteção efetiva na fase gástrica e recuperação parcial na fase intestinal — comportamento coerente com a alta retenção obtida na encapsulação e com a afinidade dos fenóis pela matriz polissacarídica. Para *Bixa orellana*, as perdas foram expressivas em todas as fases, reflexo da menor retenção inicial e da vulnerabilidade dos carotenoides às condições ácido-enzimáticas na ausência de fase lipídica. Nesse caso, a proporção extrato:carreador, embora sem efeito sobre a retenção, revelou impacto sobre a organização estrutural da matriz e, consequentemente, sobre a proteção durante a digestão — com sinal distinto entre as duas matrizes vegetais, o que impede qualquer generalização sobre proporção ótima independente da composição do extrato.

O perfil temporal de liberação acrescentou uma dimensão que os valores médios por fase não capturam, a dinâmica interna de cada compartimento digestivo. Os dados revelaram que a proteção gástrica não é uniforme ao longo dos 120 minutos — processos de liberação e degradação ocorrem simultaneamente, e a interpretação baseada apenas

em valores médios pode subestimar ou superestimar a proteção real. Essa complementaridade entre digestibilidade por fase e perfil temporal mostrou-se metodologicamente indispensável para uma caracterização funcional mais precisa dos sistemas encapsulados. A atividade antioxidante, avaliada pelos ensaios DPPH e ABTS, foi funcionalmente expressa apenas na fase intestinal, captada exclusivamente pelo ABTS — padrão consistente com o perfil de liberação de sistemas à base de polissacarídeos e com as condições de pH e ação enzimática que caracterizam esse compartimento. A ausência de resposta DPPH em todas as condições refletiu uma limitação metodológica do ensaio para matrizes aquosas complexas pós-digestão, e não ausência de compostos funcionais.

Em conjunto, os resultados demonstram que a compatibilidade físico-química entre composto e carreador é o fator central do desempenho do sistema — sobrepondo-se à proporção de encapsulante e à eficiência do processo de secagem —, e que a matriz de maltodextrina e goma arábica é tecnologicamente adequada para compostos fenólicos hidrofílicos em aplicações onde proteção gástrica e liberação intestinal são objetivos funcionais relevantes. Para compostos apolares, a incorporação de fase lipídica ao sistema encapsulante é indicada como condição necessária para ampliar tanto a retenção quanto a recuperação durante a digestão simulada.

Capítulo 6

Conclusões Gerais e Perspectivas Futuras

Esta dissertação desenvolveu, otimizou e aplicou sistemas de solventes eutéticos naturais para a extração de compostos bioativos de *Bixa orellana* e *Genipa americana*, duas espécies de relevância biológica e socioeconômica para a Amazônia. O trabalho foi construído em etapas sequencialmente dependentes — seleção, otimização, caracterização, encapsulação e avaliação da digestibilidade —, de modo que cada resultado condicionou as decisões da etapa seguinte. O sentido do conjunto só se revela quando essas etapas são lidas em continuidade, e não de forma isolada.

O princípio que unifica os resultados dos três capítulos experimentais é a compatibilidade físico-química entre o solvente e os compostos-alvo. Esse princípio não foi postulado como hipótese inicial — emergiu dos dados da triagem preliminar e se confirmou em cada etapa subsequente, do rendimento extrativo ao comportamento do material encapsulado ao longo da digestão simulada.

A avaliação preliminar de oito sistemas extrativos — seis NADES e dois hidroalcoólicos convencionais — atendeu aos dois primeiros objetivos específicos da dissertação: avaliar comparativamente o efeito de diferentes sistemas na extração de carotenoides, compostos fenólicos e atividade antioxidante, e selecionar os sistemas mais promissores para cada matriz. Os resultados demonstraram que os solventes eutéticos naturais são capazes de superar os solventes orgânicos convencionais na extração de bioativos de *B. orellana* e *G. americana* — com diferenças que não podem ser atribuídas a variações operacionais, mas à natureza das interações estabelecidas entre os componentes do solvente e os compostos-alvo.

Para as sementes de *Bixa orellana*, o sistema hidrofóbico Thy:Lac alcançou teor de carotenoides expressivamente superior ao de metanol 80% e etanol 50%, sendo o único

sistema a se diferenciar estatisticamente de todos os demais na triagem. Para o jenipapo (*Genipa americana*), os sistemas baseados em cloreto de colina extraíram compostos fenólicos em concentrações de uma a duas ordens de magnitude superiores às obtidas com os solventes convencionais. Essa superioridade não foi uniforme, sistemas NADES inadequados — como o ChCl:Gly para carotenoides do urucum, ou os sistemas sem componente iônico para fenólicos do jenipapo — apresentaram desempenho inferior ao dos controles convencionais. O conjunto desses resultados demonstra que a vantagem dos NADES é real e mensurável, mas depende de seleção criteriosa orientada pela estrutura dos compostos-alvo.

A caracterização por FTIR-ATR dos sistemas Thy:Lac e ChCl:Lac forneceu evidência estrutural da reorganização intermolecular responsável pelo comportamento eutético. Em ambos os sistemas, o deslocamento expressivo da banda O–H para menores frequências indicou a formação de redes de ligações de hidrogênio entre os componentes. No Thy:Lac, as interações ocorreram predominantemente pelo grupamento hidroxílico, conferindo ao sistema caráter anfifílico compatível com compostos apolares como a bixina. No ChCl:Lac, as alterações adicionais nas regiões C=O e C–N evidenciaram a participação do grupamento carbonílico e do nitrogênio quaternário — padrão internamente coerente com o caráter polar e iônico do sistema e com seu desempenho na extração de fenólicos de *G. americana*.

A otimização das condições de extração pelo delineamento Box–Behnken associado à metodologia de superfície de resposta revelou que os dois sistemas respondem de forma fundamentalmente distinta às variáveis de processo. Para o Thy:Lac, proporção molar e temperatura atuaram como co-determinantes do rendimento de carotenoides, de forma independente - a composição controlou o balanço anfifílico do solvente e sua afinidade com a bixina; a temperatura controlou a mobilização cinética desses compostos a partir da matriz sólida das sementes de urucum. Para o ChCl:Lac, apenas a proporção molar foi estatisticamente significativa — temperatura e tempo exerceram influência marginal —, indicando que, em sistemas hidrofílicos aplicados a fenólicos polares, a disponibilidade de sítios de interação é mais determinante do que a cinética do processo.

Os ganhos em relação à triagem foram expressivos - cerca de 28% para carotenoides de *B. orellana* e mais de 100% para fenólicos de *G. americana*. Essa diferença

de magnitude evidencia que o potencial extrativo do ChCl:Lac estava sendo amplamente subestimado nas condições não otimizadas, e que a etapa de otimização foi determinante para a expressão plena da capacidade do sistema. A atividade antioxidante por DPPH no extrato de jenipapo só se tornou mensurável após a otimização — resultado que ilustra a relação funcional direta entre efeito extrativo e expressão das propriedades bioativas. Sem essa etapa, a qualidade funcional do extrato permaneceria subestimada.

A avaliação dos extratos otimizados quanto à atividade antioxidante, estabilidade de pH e análise colorimétrica revelou perfis funcionais qualitativamente distintos entre as duas matrizes. O extrato de urucum apresentou maior reatividade frente ao ABTS, consistente com o caráter lipofílico dos carotenoides; o extrato de jenipapo demonstrou desempenho superior por DPPH e FRAP, reflexo da diversidade de mecanismos antioxidantes dos compostos fenólicos hidrofílicos. A estabilidade cromática do extrato de *B. orellana* foi alta após ajuste inicial, enquanto o de *G. americana* permaneceu em transformação ativa ao longo dos 28 dias avaliados — comportamento coerente com a química reativa da genipina. A caracterização por FTIR dos extratos otimizados complementou esse quadro - no sistema hidrofóbico Thy:Lac, as assinaturas espectrais do solvente ocuparam as principais regiões funcionais do extrato; no sistema hidrofílico ChCl:Lac, foi possível discriminar bandas de origem vegetal compatíveis com ligações glicosídicas e insaturações aromáticas de iridoides e fenólicos de *G. americana*.

A encapsulação por liofilização com maltodextrina e goma arábica resultou em materiais particulados funcionais com composição definida, cujo desempenho foi diferenciado entre os compostos. A retenção dos fenóis de *G. americana* foi de aproximadamente 79%, reflexo da afinidade entre compostos hidrofílicos e a matriz polar dos carreadores. A retenção dos carotenoides de *B. orellana* ficou entre 43 e 46%, determinada pela incompatibilidade intrínseca entre compostos apolares e um sistema encapsulante sem fase lipídica. O rendimento de secagem homogêneo entre as formulações confirmou que essa diferença é atribuível à etapa de incorporação dos compostos à matriz aquosa, e não ao processo de secagem.

A digestibilidade in vitro pelo protocolo INFOGEST avaliou o perfil de liberação e a manutenção da funcionalidade dos compostos ao longo das fases oral, gástrica e intestinal. Para *G. americana*, a formulação 1:3 apresentou proteção efetiva na fase gástrica e

recuperação parcial na fase intestinal — padrão coerente com a alta retenção inicial e com a resistência de matrizes polissacarídicas ao pH ácido. Para *B. orellana*, as perdas foram expressivas em todas as fases, reflexo da menor retenção e da vulnerabilidade dos carotenoides na ausência de fase lipídica. O perfil temporal de liberação revelou que processos de liberação e degradação ocorrem simultaneamente ao longo da digestão gástrica, e que os valores médios por compartimento, isoladamente, podem subestimar ou superestimar a proteção real. A atividade antioxidante foi funcionalmente expressa apenas na fase intestinal e captada exclusivamente pelo ABTS — padrão consistente com as condições de pH e ação enzimática desse compartimento e com as limitações metodológicas do DPPH em matrizes aquosas complexas pós-digestão.

As contribuições científicas do trabalho situam-se em três planos distintos. No plano do conhecimento sobre a biodiversidade amazônica, este é o primeiro estudo a avaliar sistematicamente NADES para a extração de carotenoides de *B. orellana* e de compostos fenólicos e iridoides de *G. americana*, estabelecendo parâmetros de desempenho e mecanismos de controle inéditos para essas matrizes. No plano metodológico, a abordagem comparativa — avaliando múltiplos sistemas sobre duas matrizes e duas classes de compostos simultaneamente — demonstrou-se mais informativa do que estudos de sistema único, ao revelar padrões de compatibilidade que transcendem a especificidade de cada par solvente-matriz. No plano tecnológico, o trabalho demonstrou a viabilidade de uma cadeia processual verde para bioativos amazônicos, da extração à avaliação do comportamento funcional pós-digestão, sem etapas de remoção de solvente do extrato.

O trabalho apresenta limitações que merecem reconhecimento explícito. As condições ótimas identificadas pelo Box–Behnken coincidem com bordas do ponto experimental em ambos os sistemas, o que impede confirmar se o ótimo real foi alcançado. A ausência de confirmação cromatográfica dos compostos individuais nos extratos — bixina, norbixina, genipina, geniposídeo — limita as afirmações sobre seletividade extrativa ao nível dos grupos quantificados pelos ensaios globais. A ausência de replicatas nas formulações encapsuladas restringiu a análise de retenção ao nível descritivo, e a ausência de dados morfológicos das partículas impede a confirmação das hipóteses estruturais formuladas. A avaliação toxicológica dos sistemas NADES formulados não foi conduzida; a classificação dos componentes individuais como GRAS é um indicativo favorável, mas não substitui a

avaliação experimental dos sistemas binários e ternários.

As perspectivas que emergem diretamente dos dados obtidos são precisas e coerentes com as lacunas identificadas. A confirmação química dos extratos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas é a etapa analítica mais urgente, necessária para quantificar individualmente os compostos-alvo e caracterizar co-extraídos que possam influenciar a bioatividade. A expansão das faixas do delineamento experimental — especialmente para proporção molar no Thy:Lac e para tempo no ChCl:Lac — permitiria verificar se os ótimos identificados são locais ou globais. A investigação de NADES hidrofóbicos alternativos, como os baseados em mentol, poderia ampliar o repertório de solventes verdes aplicáveis ao urucum e fornecer base comparativa para os resultados obtidos com o Thy:Lac.

Para a encapsulação, a incorporação de fase lipídica ao sistema carreador é a condição mais diretamente indicada pelos dados para melhorar a retenção e a recuperação de carotenoides de *B. orellana*. A avaliação da reutilização dos NADES após extração e o estudo do impacto sensorial de componentes como o timol sobre os extratos são lacunas relevantes para a viabilidade de aplicações alimentares. Os perfis farmacológicos documentados para bixina e genipina — que incluem atividade anti-inflamatória, antioxidante e citoprotetora, conforme revisado no referencial teórico desta dissertação — conferem relevância terapêutica adicional aos extratos em contextos que demandam proteção de superfícies mucosas. O sistema encapsulado, ao demonstrar proteção gástrica e liberação modulada de bioativos na fase intestinal, fornece base técnica para investigar sua incorporação em formas de administração oral local, como filmes comestíveis de desintegração oral. Nessa perspectiva, a capacidade reticulante da genipina para biopolímeros como quitosana e gelatina — documentada no referencial teórico desta dissertação — posiciona o extrato de *G. americana* não apenas como fonte de compostos bioativos, mas também como agente funcional na formulação da própria matriz filmogênica, convergindo funções que raramente coexistem em um único extrato vegetal.

A validação em modelos com tecido mucoso permanece como etapa necessária para que afirmações sobre eficácia funcional local possam ser feitas com sustentação científica adequada. Os dados de digestibilidade in vitro obtidos aqui constituem uma base de hipóteses testáveis, e não uma prova de eficácia biológica.

Os resultados desta dissertação posicionam os solventes eutéticos naturais como alternativas extratoras tecnologicamente viáveis para espécies amazônicas de relevância biotecnológica — não como substitutos universais dos solventes orgânicos convencionais, mas como sistemas cuja superioridade é demonstrável quando há correspondência deliberada entre composição e composto-alvo. Os materiais particulados liofilizados obtidos constituem sistemas funcionais com composição definida e desempenho avaliado em condição de aplicação tecnológica concreta. O desenvolvimento de um filme comestível a partir desses encapsulados representaria um material derivado com arquitetura e funcionalidade distintas, cuja concepção é diretamente sustentada pelos dados aqui gerados. Essa continuidade entre o material desenvolvido e o material projetado é o encerramento lógico desta dissertação e o ponto de partida mais fundamentado para a pesquisa subsequente.

Referências

[1] Shicai Sun, Ying Yu, Yunju Jo, Jung Ho Han, Yingqi Xue, Min Kyoung Cho, Sung-Jin Bae, Dongryeol Ryu, Wonyoung Park, Ki-Tae Ha, and Shiwei Zhuang. Impact of extraction techniques on phytochemical composition and bioactivity of natural product mixtures. *Frontiers in Pharmacology*, 16, 2025.

[2] Rodrigo Silva, Candice Carneiro, Cheila Sousa, Federico Gomez, Magdalena Espino, Joana Boiteux, María Fernández, Maria Silva, and Fábio Dias. Sustainable extraction bioactive compounds procedures in medicinal plants based on the principles of green analytical chemistry: A review. *Microchemical Journal*, 175:107184, 01 2022.

[3] Marwan Maki, Kin Tan, Melanie Yee, Dinesh Mishra, M. Venkatesh, Omar Abduljaleel, Mesut Karahan, and Palanirajan Kumar. Green solvents as a sustainable strategy to reduce the impact of hazardous waste on human health. *Discover Chemistry*, 2, 12 2025.

[4] Nurin Hidayah Julshahril, Eng Tong Phuah, and Mas Munira Rambli. Deep eutectic solvents in the extraction of bioactive compounds in agri-food industry. *Food and Humanity*, 2025.

[5] Asma Ashraf, Muhammad Umar Ijaz, Saima Muzammil, Muhammad Muzammil Nazir, Saima Zafar, S.M. Neamul Kabir Zihad, Shaikh Jamal Uddin, Md Saquib Hasnain, and Amit Kumar Nayak. The role of bixin as antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, and skin protecting natural product extracted from bixa orellana l. *Fitoterapia*, 169:105612, 2023.

[6] Farid Chemat, Maryline Abert-Vian, Anne Sylvie Fabiano-Tixier, Jochen Strube, Lukas Uhlenbrock, Veronika Gunjevic, and Giancarlo Cravotto. Green extraction

of natural products. origins, current status, and future challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118:248–263, 2019.

[7] Yuntao Dai, Jaap van Spronsen, Geert-Jan Witkamp, Robert Verpoorte, and Young Hae Choi. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766:61–68, 2013.

[8] Young Hae Choi, Jaap van Spronsen, Yuntao Dai, Marianne Verberne, Frank Hollmann, Isabel W.C.E. Arends, Geert-Jan Witkamp, and Robert Verpoorte. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiology*, 156(4):1701–1705, 08 2011.

[9] Felipe Bragagnolo, Monique Strieder, Rodrigo Pizani, Leonardo Mesquita, Maria Gonzalez-Miquel, and Mauricio Rostagno. Revisiting natural deep eutectic solvents (nades) as extraction media and ready-to-use purposes. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, page 117726, 04 2024.

[10] Mee Mee Huang, Chung Loong Yiin, Serene Sow Mun Lock, Bridgid Lai Fui Chin, Inawati Othman, Nur Syuhada binti Ahmad Zauzi, and Yi Herng Chan. Natural deep eutectic solvents (nades) for sustainable extraction of bioactive compounds from medicinal plants: Recent advances, challenges, and future directions. *Journal of Molecular Liquids*, 425:127202, 2025.

[11] Karina Pinheiro Martins, Nathália Letícia Hernandez Brito, Gustavo Barreto Costa, Jhony Silva Ramos, Ana Caroline Silvestre Barbosa Alessi, Thais Aparecida Santos, Ana Elisa Melo da Silva, Isaac Felipe Machado, Leila Larisa Medeiros Marques, Adriana Aparecida Droval Arcain, and Flávia Aparecida Reitz Cardoso. Natural deep eutectic solvents (nades) in food systems: Emerging applications, extraction efficiency, safety concerns, and regulatory challenges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 73(52):32982–32994, 2025.

[12] Rana Alsaidi and Thies Thiemann. Use of natural deep eutectic solvents (nades) in food science and food processing. *Sustainability*, 17(5), 2025.

[13] Ciro Cannavacciuolo, Stefania Pagliari, Jessica Frigerio, Chiara Maria Giustra, Massimo Labra, and Luca Campone. Natural deep eutectic solvents (nadess) combined

with sustainable extraction techniques: A review of the green chemistry approach in food analysis. *Foods*, 12(1), 2023.

[14] Adriana Viñas-Ospino, Daniel López-Malo, María Jose Esteve, Ana Frígola, and Jesús Blesa. Improving carotenoid extraction, stability, and antioxidant activity from citrus sinensis peels using green solvents. *European Food Research and Technology*, 249:3, 06 2023.

[15] Georgiana Ileana Badea, Florentina Gatea, Simona Carmen Litescu-Filipescu, Andreia Alecu, Ana Chira, Celina Maria Damian, and Gabriel Lucian Radu. Optimization of green ultrasound-assisted extraction of carotenoids and tocopherol from tomato waste using nadess. *Molecules*, 30(3), 2025.

[16] Luis Acosta-Vega, Alejandro Cifuentes, Elena Ibáñez, and Paula Galeano Garcia. Exploring natural deep eutectic solvents (nades) for enhanced essential oil extraction: Current insights and applications. *Molecules*, 30(2), 2025.

[17] Ianê Valente Pires, Antonio Manoel da Cruz Rodrigues, Wandson Braamcamp de Souza Pinheiro, Luis Nelson Cardoso, C. Filho, Marleny D.A. Saldaña, and Luiza Helena Meller da Silva. Physicochemical properties, antioxidant potential, and spectroscopic investigation of choline chloride–lactic acid nades: Effects of molar ratio and added water. *Journal of Molecular Liquids*, 437:128414, 2025.

[18] Samanta Daliana Golin Pacheco, Alexia Thamara Gasparin, Carlos Henrique Alves Jesus, Bruna Bittencourt Sotomaior, Ana Clara Sans Salomão Brunow Ventura, Daiany Darlly Belo Redivo, Daniela de Almeida Cabrini, Josiane de Fátima Gaspari Dias, Marilis Dallarmi Miguel, Obdulio Gomes Miguel, and Joice Maria da Cunha. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of bixin, a carotenoid extracted from the seeds of bixa orellana. *Planta medica*, 85(16):1216—1224, November 2019.

[19] Victor A. Franklin, Edgar M. Bach Hi, Nilsa S. Y. Wadt, and Erna E. Bach. Aqueous extract from urucum (bixa orellana l.): antimicrobial, antioxidant, and healing activity. *Porto biomedical journal*, 8, 2023.

[20] Deborah Fernandes Rodrigues, Marina Vieira, Marcel Alexandre Formaggio Moraes Júnior, Rodrigo Michelini Oliveira Thomasi, Ruben Dario Sinisterra Millán,

Eliana Faria Garcia, Renê Oliveira Couto, William Gustavo Lima, Magna Cristina Paiva, and Carlos Eduardo Matos Jensen. Bixin from bixa orellana l.: Analytical method validation, physicochemical characterization, and selective antifungal activity against candida spp.. *ACS Omega*, 10(33):37874–37888, 2025.

[21] Nila Baburaj, Sudha Paramadhas, S. Kishore, R. Rahul, Meyyammai Annamalai, Murugesan Balakrishnan, Preetha Palanisamy, and Madhuresh Dwivedi. Sustainable enzyme-assisted extraction of bixin and norbixin from bixa orellana seeds: Evaluation of yield, quality attributes, and microstructural changes. *Journal of Food Measurement and Characterization*, pages 1–25, 01 2026.

[22] Lariza Leisla Leandro Nascimento, Geane Gabriele de Oliveira Souza, Johnatan Wellisson da Silva Mendes, Ana Cecília Calixto Donelardy, José Jonas Ferreira Viturino, Natália Kelly Gomes de Carvalho, Débora Odília Duarte Leite, José Galberto Martins da Costa, and Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues. Genipa americana l.: A review on traditional uses, phytochemistry and biological activities. *Chemistry & Biodiversity*, 21(11):e202400748, 2024.

[23] Iramaia Angelica Neri-Numa, Marina Gabriel Pessôa, Henrique Silvano Arruda, Gustavo Araujo Pereira, Bruno Nicolau Paulino, Célio Fernando Figueiredo Angolini, Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz, and Glaucia Maria Pastore. Genipap (genipa americana l.) fruit extract as a source of antioxidant and antiproliferative iridoids. *Food Research International*, 134:109252, 2020.

[24] Adria de Sousa Bentes and Adriana Zerlotti Mercadante. Influence of the stage of ripeness on the composition of iridoids and phenolic compounds in genipap (genipa americana l.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(44):10800–10808, 2014.

[25] Danuta Sobolewska, Agnieszka Galanty, Karolina Grabowska, Justyna Makowska-Wąs, Irma Podolak, and Dagmara Wróbel-Biedrawa. Genipin—simple but significant bioactive iridoid for therapeutical application and beyond: A review. *Life*, 15(2), 2025.

[26] Dong Xu, Tao Qiao, Kai Gao, Mei-Na Zhao, Wei Zhang, Xing-Ru Tao, and Jing-Wen Wang. A scientific data-driven review of natural product genipin for disease therapy. *Phytochemistry Reviews*, 24(5):4425–4450, October 2025.

[27] Grazielle Náthia-Neves, Adriana Gadioli Tarone, Milena Martelli Tosi, Mário Roberto Maróstica Júnior, and M. Angela A. Meireles. Extraction of bioactive compounds from genipap (genipa americana l.) by pressurized ethanol: Iridoids, phenolic content and antioxidant activity. *Food Research International*, 102:595–604, 2017.

[28] Brasil. Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, 2015.

[29] Brasil. Decreto nº 8.772, de 11 de maio de 2016. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, 2016.

[30] Andrew P. Abbott, Glen Capper, David L. Davies, Raymond K. Rasheed, and Vasuki Tambyrajah. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem. Commun.*, pages 70–71, 2003.

[31] Dinis O. Abranches and João A. P. Coutinho. Everything you wanted to know about deep eutectic solvents but were afraid to be told. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 14:141–163, 2023.

[32] Sushma P. Ijardar, Vickramjeet Singh, and Ramesh L. Gardas. Revisiting the physicochemical properties and applications of deep eutectic solvents. *Molecules*, 27(4), 2022.

[33] Qinghua Zhang, Karine De Oliveira Vigier, Sébastien Royer, and François Jérôme. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem. Soc. Rev.*, 41:7108–7146, 2012.

[34] Li Duan, Li-Li Dou, Long Guo, Ping Li, and E-Hu Liu. Comprehensive evaluation of deep eutectic solvents in extraction of bioactive natural products. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(4):2405–2411, 2016.

[35] Emma L. Smith, Andrew P. Abbott, and Karl S. Ryder. Deep eutectic solvents (dess) and their applications. *Chemical Reviews*, 114(21):11060–11082, 2014.

[36] Alexandre Paiva, Rita Craveiro, Ivo Aroso, M. Martins, Rui L. Reis, and Ana Duarte. Natural deep eutectic solvents – solvents for the 21st century. *ACS Sustainable Chemistry Engineering*, 2:1063–1071, 03 2014.

[37] Oscar Zannou and Ilkay Koca. Optimization and stabilization of the antioxidant properties from alkanet (alkanna tinctoria) with natural deep eutectic solvents. *Arabian Journal of Chemistry*, 13, 06 2020.

[38] Oscar Zannou, Ilkay Koca, Turki M. S. Aldawoud, and Charis M. Galanakis. Recovery and stabilization of anthocyanins and phenolic antioxidants of roselle (hibiscus sabdariffa l.) with hydrophilic deep eutectic solvents. *Molecules*, 25(16), 2020.

[39] Yuntao Dai, Geert-Jan Witkamp, Robert Verpoorte, and Young Hae Choi. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chemistry*, 187:14–19, 2015.

[40] Farid Chemat, Maryline Abert Vian, Anne-Sylvie Fabiano-Tixier, Marinela Nutrizio, Anet Režek Jambrak, Paulo E. S. Munekata, Jose M. Lorenzo, Francisco J. Barba, Arianna Binello, and Giancarlo Cravotto. A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products. *Green Chem.*, 22:2325–2353, 2020.

[41] Mariana Ruesgas Ramon, Maria Cruz Figueroa-Espinoza, and Erwann Durand. Application of deep eutectic solvents (des) for phenolic compounds extraction: Overview, challenges, and opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 04 2017.

[42] Michael Scotter. The chemistry and analysis of annatto food colouring: A review. *Food Additives Contaminants: Part A*, 26:1123–1145, 08 2009.

[43] R.H. Myers, D.C. Montgomery, and Christine Anderson-Cook. Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments. *Wiley Series in Probability and Statistics*, 705, 01 2016.

[44] Alberto Souza Paes, Rosemary de Carvalho Rocha Koga, Priscila Faimann Sales, Hellen Karine Santos Almeida, Thiago Afonso Carvalho Celestino Teixeira, and José

Carlos Tavares Carvalho. Phytocompounds from amazonian plant species against acute kidney injury: Potential nephroprotective effects. *Molecules*, 28(17), 2023.

[45] Augustin Scalbert and Gary Williamson. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130:2073S–2085S, 08 2000.

[46] Peter Hollman and Ilja Arts. Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80:1081 – 1093, 05 2000.

[47] Maria do Socorro M. Rufino, Ricardo E. Alves, Edy S. de Brito, Jara Pérez-Jiménez, Fulgencio Saura-Calixto, and Jorge Mancini-Filho. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from brazil. *Food Chemistry*, 121(4):996–1002, 2010.

[48] Delia B. Rodriguez-Amaya. A guide to carotenoid analysis in foods. *Agricultural and Food Sciences*, 1999.

[49] G. Britton, S. Liaaen-Jensen, and H. Pfander. *Carotenoids, Volume 1B: Spectroscopy*. Carotenoids. Birkhäuser Basel, 1994.

[50] Thiago Sevilhano Puglieri and Laura Maccarelli. Paint and coloring materials from the brazilian amazon forest: Beyond urucum and jenipapo. *Heritage*, 6:5883–5898, 08 2023.

[51] Priscila Moreira, Juliana Lins, Gabriel Dequigiovanni, Elizabeth Veasey, and Charles Clement. The domestication of annatto (bixa orellana) from bixa urucurana in amazonia. *Economic Botany*, 69, 05 2015.

[52] H.W. Sung, R.N. Huang, LL Huang, and C.C. Tsai. In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 10:63–78, 01 1999.

[53] Sébastien Gouin. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science Technology*, 15:330–347, 07 2004.

[54] Zhongxiang Fang and Bhesh Bhandari. Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science Technology*, 21(10):510–523, 2010.

[55] Isabel Martins, M. Barreiro, Manuel Coelho, and Alírio Rodrigues. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chemical Engineering Journal*, 245:191–200, 06 2014.

[56] M. Minekus, M. Alminger, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu, F. Carrière, R. Boutrou, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, L. Egger, M. Golding, S. Karakaya, B. Kirkhus, S. Le Feunteun, U. Lesmes, A. Macierzanka, A. Mackie, S. Marze, D. J. McClements, O. Ménard, I. Recio, C. N. Santos, R. P. Singh, G. E. Vegarud, M. S. J. Wickham, W. Weitschies, and A. Brodkorb. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.*, 5:1113–1124, 2014.

[57] A Brodkorb, L Egger, M Alminger, P Alvito, R Assuncao, S Ballance, T Bohn, C Bourlieu-Lacanal, R Boutrou, F Carriere, A Clemente, M Corredig, D Dupont, C Dufour, C Edwards, M Golding, S Karakaya, B Kirkhus, S Le Feunteun, U Lesmes, A Macierzanka, AR Mackie, C Martins, S Marze, DJ McClements, O Menard, M Minekus, R Portmann, CN Santos, I Souchon, RP Singh, GE Vegarud, MSJ Wickham, W Weitschies, and I Recio. Infogest static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4):991–1014, April 2019. This article is protected by copyright. All rights reserved. This is an author produced version of a paper published in Nature Protocols. Uploaded in accordance with the publisher's self-archiving policy.

[58] Paula Jauregi, Leire Esnal-Yeregi, and Jalel Labidi. Natural deep eutectic solvents (nades) for the extraction of bioactives: emerging opportunities in biorefinery applications. *PeerJ Analytical Chemistry*, 2024.

[59] Qi Koh, Zhi Chew, Yingzhan Zhao, Yin Leng Kua, Suyin Gan, Khang Wei Tan, Terri Lee, and Harrison Nang. Formulation and characterization of natural deep eutectic solvents (nades) for simultaneous phenolics and carotenes extraction from fresh oil palm leaf. *Food and Bioproducts Processing*, 147, 08 2024.

[60] Chiara Spaggiari, Laura Carbonell-Rozas, Han Zuilhof, Gabriele Costantino, and Laura Righetti. Structural elucidation and long-term stability of synthesized nades:

A detailed physicochemical analysis. *Journal of Molecular Liquids*, 424:127105, 02 2025.

[61] Dora Valencia, Dolores Aguilar-González, Jesus Ortega García, Gregorio Godoy, Mario Leyva Peralta, Víctor Moo-Huchin, Rayn Aarland, Jael Quintero, jose alberto Mendoza, and Addy Zarza-García. Phytochemical profile, antioxidant and antiproliferative activity from leaves and seeds of bixa orellana l. from the yucatán peninsula, mexico. *Pharmacognosy Magazine*, 19:097312962311584, 04 2023.

[62] Renata Assis, Gabrielly Monteiro, Ashley Valentim, Carla Maia, Stela Felipe, Claisa Rabelo, Vânia Ceccatto, and Carlucio Alves. Biological properties of bioactive compounds from the fruit and leaves of the genipap tree (genipa americana l.): A systematic review. *Food Bioscience*, 53:102514, 03 2023.

[63] Tenila Faria, Miria Reis, Vivian Schmidt, and Vicelma Cardoso. Influence of extraction methods on phenolic compounds from pulp and peel of genipap (genipa americana l.) fruit. *International Journal of Food Studies*, 11:38–50, 04 2022.

[64] Yuxuan Zhang, Jameson R Hunter, Ahamed Ullah, Qing Shao, and Jian Shi. Lignin derived hydrophobic deep eutectic solvents for the extraction of nanoplastics from water. *Journal of Hazardous Materials*, 467:133695, 2024.

[65] Grazielle Oliveira, Caroline Marques, Anielle de Oliveira, Amanda de Almeida dos Santos, Wanderlei do Amaral, Rafael Porto Ineu, Fernanda Vitória Leimann, Ana Paula Peron, Luciana Igarashi-Mafra, and Marcos R Mafra. Extraction of bioactive compounds from curcuma longa l. using deep eutectic solvents: In vitro and in vivo biological activities. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 70:102697, 2021.

[66] Alaine Duque, Antton Sanjuan, M Mounir Bou-Ali, Rosa M Alonso, and Miguel A Campanero. Physicochemical characterization of hydrophobic type iii and type v deep eutectic solvents based on carboxylic acids. *Journal of Molecular Liquids*, 392:123431, 2023.

[67] Minghui Li, Cheng Rao, Chengxiao Wang, Xiuming Cui, and Yin Xiong. Natural deep eutectic solvents-based selective extraction of saponins from panax notogin-

seng: Process optimization, chemical profiling, and bioactivities evaluation. *Separation and Purification Technology*, 341:126882, 2024.

[68] Lucia Sportiello, Emanuele Marchesi, Roberta Tolve, and Fabio Favati. Green Extraction of Carotenoids from Pumpkin By-Products Using Natural Hydrophobic Deep Eutectic Solvents: Preliminary Insights. *Molecules*, 30, 2025.

[69] Merichel Plaza and María Luisa Marina. Hydrophobic natural deep eutectic solvents for the sustainable extraction of carotenoids from persimmon peels. *Microchemical Journal*, 208, 2025.

[70] Mila Lazović, Marko D. Jović, Marija Petrović, Ivica Z. Dimkić, Uroš M. Gašić, Dušanka M. Milojković Opsenica, Petar M. Ristivojević, and Jelena Trifković. Potential application of green extracts rich in phenolics for innovative functional foods: natural deep eutectic solvents as media for isolation of biocompounds from berries. *Food and Function*, 15(8):4122–4139, 2024.

[71] Zilin Wang, Yang Tian, Min Yang, Junyan Yang, Yifan Wang, Liang Tao, Jun Sheng, and Chongying Shi. Extraction of phenolic compounds from Moringa oleifera Lam. leaves with ultrasonic-assisted deep eutectic solvents. *Frontiers in Nutrition*, 11:1–16, 2024.

[72] Bharat Maitreya and Swati Jayswal. Estimation of total phenolic content (tpc) of selected allium species of gujarat using different extracts. *PLANT ARCHIVES*, 21, 05 2021.

[73] Magdalena Kręcisz, Joanna Kolniak-Ostek, Jacek Łyczko, and Bogdan Stępień. Evaluation of bioactive compounds, volatile compounds, drying process kinetics and selected physical properties of vacuum impregnation celery dried by different methods. *Food Chemistry*, 413:135490, 2023.

[74] QC Li, T Liu, XM Chen, M Cai, X Liu, and Z Zeng. Correlation analysis of the color and total carotenoid content in paphia textile foot tissue. *Marine Sciences*, 40(10):120–125, 2016.

[75] Luciedry Matheus de Souza Carvalho, Maria Claria Machado Lemos, Edgar Aparecido Sanches, Laiane Souza da Silva, Jaqueline de Araújo Bezerra, Jaime Paiva Lo-

pes Aguiar, Francisca das Chagas do Amaral Souza, Elenilson G Alves Filho, and Pedro Henrique Campelo. Improvement of the bioaccessibility of bioactive compounds from amazon fruits treated using high energy ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 67:105148, 2020.

[76] Adela F Dobre, Augustin M Madalan, Victorita Tecuceanu, Anamaria Hanganu, and Petre Ionita. Synthesis of novel p-aminophenyl derivates od dpph free radical. *REVUE ROUMAINE DE CHIMIE*, 69(1-2), 2024.

[77] Remy Romanet, Christian Coelho, Youzhong Liu, Florian Bahut, Jordi Ballester, Maria Nikolantonaki, and Régis D Gougeon. The antioxidant potential of white wines relies on the chemistry of sulfur-containing compounds: An optimized dpph assay. *Molecules*, 24(7):1353, 2019.

[78] Yannick Ngueumaleu, Arlette Danelle Djitieu Deutchoua, Sarrah Sonita Poungoue Hanga, Rossel Wendji Liendji, Gustave Kenne Dedzo, and Emmanuel Ngameni. Probing the reactivity of 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph) with metal cations and acids in acetonitrile by electrochemistry and uv-vis spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 25(6):5282–5290, 2023.

[79] Arlette Danelle Djitieu Deutchoua, Yannick Ngueumaleu, Rossel Wendji Liendji, Sarrah Sonita Poungoue Hanga, Bruno Boniface Nguelo, Gustave Kenne Dedzo, and Emmanuel Ngameni. Unusual reactivity of 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph) with fe 3+ controlled by competing reactions. *RSC advances*, 14(2):1354–1359, 2024.

[80] P Molyneux. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (dpph) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26, 2004.

[81] Maria Do, Socorro Rufino, Ricardo Alves, Edy Brito, Selene Morais, Caroline Sampaio, Jara Pérez-Jiménez, Fulgencio Saura-Calixto, Foto Maria, and Socorro Rufino. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre dpph. *Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA)*, 2007.

[82] A.C. Silveira, Y.S. Kassuia, R.C. Domahovski, and M. Lazzarotto. Método de dpph adaptado: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de

frutos da erva-mate de forma rápida e reprodutível. *Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA)*, 2018.

[83] V.M. Sacramento, V.A. Royo, P.H.F Veloso, K.S.F. Souto, and A.F.M. Junior. Métodos para determinação de capacidade antioxidante. *Editora Atena*, 2023.

[84] Andrew Jones, Agustín Acquaviva, Thirada Suktham, Gary R Dennis, R Andrew Shalliker, and Arianne Soliven. Total antioxidant capacity with peak specificity via reaction flow chromatography and the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Analytical Methods*, 13:608–616, 2020.

[85] Maria Do, Socorro Rufino, Ricardo Alves, Edy Brito, Selene Morais, Caroline Sampaio, Jara Pérez-Jiménez, Fulgencio Saura-Calixto, Foto Maria, and Socorro Rufino. Metodologia científica:determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (frap). *Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA)*, 2006.

[86] Mary de Fátima Guedes Dos Santos, Rosa Virginia Soares Mamede, Maria do Socorro Moura Rufino, Edy Sousa De Brito, and Ricardo Elesbão Alves. Amazonian native palm fruits as sources of antioxidant bioactive compounds. *Antioxidants*, 4(3):591–602, 2015.

[87] Bin Tang and Fan Zhang. Fourier transform infrared spectroscopy. *Energy Storage Materials Characterization: Determining Properties and Performance*, 2:419–446, 2025.

[88] Dinis O Abranches and João AP Coutinho. Type v deep eutectic solvents: Design and applications. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 35:100612, 2022.

[89] Giorgia Mannucci, Alessandro Tofoni, Matteo Busato, and Paola D'Angelo. Hydrophobicity as the key to understanding the nanostructural behavior of eutectic mixtures upon apolar cosolvent addition. *Journal of Molecular Liquids*, 394(September 2023), 2024.

[90] Deborah Oluwatomilola Adeoye, Zaharaddeen Sani Gano, Omar Umar Ahmed, Suleiman Mohammed Shuwa, Abdulazeez Yusuf Atta, and Baba Yakubu Jubril.

Synthesis and characterisation of thymol-based hydrophobic deep eutectic solvents. *Chemistry Proceedings*, 14(1):96, 2023.

[91] Pâmela da Silva Souza, Flávia Aparecida Reitz Cardoso, Mirela Vanin dos Santos Lima, Stênio Cristaldo Heck, and Leila Larisa Medeiros Marques. Extraction of bioactive compounds from peel and seeds of pitomba (talisia esculenta) using eutectic solvents. *International Journal of Food Science and Technology*, 59(12):9060–9071, 2024.

[92] Giulia Mastellone, Nabeel Mujtaba Abbasi, Cecilia Cagliero, and Jared L. Anderson. New Class of Tunable Choline Bromide-Based Hydrophobic Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Bioactive Compounds of Varying Polarity from a Plant Matrix. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 11(17):6665–6675, 2023.

[93] Getrude G. Kanyairita, Desmond G. Mortley, Melissa Boersma, and Willard E. Collier. Comparison of the Efficiency of Deep Eutectic and Organic Solvents in the Extraction of Phytochemicals from Cannabis sativa L. *Separations*, 11(4), 2024.

[94] Koray Tanrıver, Mehmet Bilgin, Selin Şahin Sevgili, İrem Toprakçı Yüksel, and Ebru Kurtulbaş Şahin. Extraction of Carotenoids from Pumpkin (Cucurbita moschata) and Spinach (Spinacia oleracea) Using Environmentally Friendly Deep Eutectic Solvents (DESs). *AppliedChem*, 5(1), 2025.

[95] Remi Nguyen, Amélie Auvigne, Antonio M Perez Merchan, Irene Malpartida, and Christophe Len. New high-throughput mechanochemical assisted continuous flow for the formation of deep eutectic solvents. *Organic Process Research & Development*, 28(9):3560–3569, 2024.

[96] Erline Yuniarti, Fadlina Chany Saputri, and Abdul Mun'im. Application of the natural deep eutectic solvent choline chloridesorbitol to extract chlorogenic acid and caffeine from green coffee beans (Coffea canephora). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 9(3):82–90, 2019.

[97] Uday M Muddapur, Bhagya Turakani, Naif A Jalal, Sami S Ashgar, Aiman M Momenah, Osama M Alshehri, Mater H Mahnashi, Ibrahim Ahmed Shaikh, Aejaz Abdullatif Khan, Salah Eldeen Dafalla, et al. Phytochemical screening of bixa

orellana and preliminary antidiabetic, antibacterial, antifibrinolytic, anthelmintic, antioxidant, and cytotoxic activity against lung cancer (a549) cell lines. *Journal of King Saud University-Science*, 35(5):102683, 2023.

[98] Tochukwu Oluwatosin Maduka, Qingyue Wang, Miho Suzuki, Christian Ebere Enyoh, Weiqian Wang, and Md. Sohel Rana. Hydrophobic natural deep eutectic solvents for extraction of bioactive compounds: Multiscale characterization, quantum simulations, and molecular interaction studies with cry j 1 and amb a 1 allergens. *Separations*, 12(8), 2025.

[99] Monia Martins, Emanuel Crespo, Paula Virginia Pontes, Liliana Silva, Mark Bülow, Guilherme Maximo, Eduardo Batista, Christoph Held, Simão Pinho, and Joao Coutinho. Tunable hydrophobic eutectic solvents based on terpenes and monocarboxylic acids. *ACS Sustainable Chemistry Engineering*, 6, 05 2018.

[100] Tatjana Jurić, Denis Uka, Berta Barta Holló, Branislav Jovic, Branko Kordić, and Boris Popovic. Comprehensive physicochemical evaluation of choline chloride-based natural deep eutectic solvents. *Journal of Molecular Liquids*, 343:116968, 07 2021.

[101] Chiara Fanali, Valeria Gallo, Susanna Posta, Laura Dugo, Leone Mazzeo, Marco Cocchi, Vincenzo Piemonte, and Laura De Gara. Choline chloride–lactic acid-based nades as an extraction medium in a response surface methodology-optimized method for the extraction of phenolic compounds from hazelnut skin. *Molecules*, 26, 05 2021.

[102] Indah Puspita Sari, Eti Artiningsih Octaviani, Shefia Dhiya Khansa, and Ganjar Fadillah. Spectroscopic insights and physicochemical properties of deep eutectic solvents formed from choline chloride and organic hydrogen bond donors. *Analit : Analytical and Environmental Chemistry*, 9(02):11–22, Nov. 2024.

[103] Indah Puspita Sari, Annisaa Siti Zulaicha, and Sinta Bella Triyanti. Choline chloride based deep eutectic solvents: Physicochemical properties and spectroscopic insights. *Analit : Analytical and Environmental Chemistry*, 9(02):23–34, Nov. 2024.

[104] Anastasia Kyriakoudi, Alexandros Tsiouras, and Ioannis Mourtzinos. Extraction of lycopene from tomato using hydrophobic natural deep eutectic solvents based on terpenes and fatty acids. *Foods*, 11, 08 2022.

[105] Leandro Cabrera, Lucia Xavier, and Berta Zecchi. Extraction of phenolic compounds with antioxidant activity from olive pomace using natural deep eutectic solvents: modelling and optimization by response surface methodology. *Discover Food*, 4, 05 2024.

[106] Rachna Gupta, Anupama Singh, Prabhat Nema, Tapas Roy, Sanjay Kumar, and Avvaru Praveen Kumar. Implementation of rsm and ann optimization approach for natural deep eutectic solvents-based extraction of bioactive compounds from orange peel. *ACS Omega*, 9, 08 2024.

[107] Milena Popova, Boryana Trusheva, Ralitsa Chimshirova, Hristo Petkov, and Vassya Bankova. Green extraction of poplar type propolis: ultrasonic extraction parameters and optimization via response surface methodology. *BMC Chemistry*, 19, 09 2025.

[108] Gustavo Puma-Isuiza, Juliana García, Coralia Osorio, Indira Pallardel, Jorge Chue, and Marianela Guevara. Extraction of phenolic compounds from lucuma (pouteria lucuma) seeds with natural deep eutectic solvents: modelling using response surface methodology and artificial neural networks. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 8, 06 2024.

[109] Hyrije Koraqi, Alev Aydar, Waseem Khalid, Sarvesh Rustagi, Seema Ramniwas, and Ravi Pandiselvam. Ultrasound-assisted extraction with natural deep eutectic solvent for phenolic compounds recovery from rosa damascene mill.: Experimental design optimization using central composite design. *Microchemical Journal*, 196:109585, 01 2024.

[110] Luciano A. de Albuquerque, Marcos Levi C.M. dos Reis, Débora de A. Santana, Sérgio T. Oliva, Maria Fernanda Silva, Magdalena Espino, Federico J.V. Gomez, and Fabio de S. Dias. Optimization of natural deep eutectic solvent composition for ultrasound-assisted extraction of phenolic compound from propolis samples. *Journal of Chromatography B*, 1264:124737, 2025.

[111] Kevin Alejandro Avilés-Betanzos, Juan Valerio Cauich-Rodríguez, Marisela González-Ávila, Matteo Scampicchio, Ksenia Morozova, Manuel Octavio Ramírez-Sucre, and Ingrid Mayanin Rodríguez-Buenfil. Natural deep eutectic solvent op-

timization to obtain an extract rich in polyphenols from capsicum chinense leaves using an ultrasonic probe. *Processes*, 11(6), 2023.

[112] Nicoleta Balan, Silviu Măntăilă, Gabriela Râpeanu, and Nicoleta Stănciuc. Enhanced extraction of bioactive compounds from red grape pomace: Optimizing ultrasound-assisted extraction with ethanol and nades as solvents. *Antioxidants*, 14, 2025.

[113] Ainur Makarova, Ceylin Özten, and Bartłomiej Zieniuk. Utilizing natural deep eutectic solvents (nadess) for sustainable phytonutrient recovery: Optimization and multi-matrix extraction of bioactive compounds. *Applied Sciences*, 15(9), 2025.

[114] Yasmin Sakurai, Ianê Pires, Nelson Ferreira, Sanclayton Moreira, Luiza Silva, and Antonio Rodrigues. Preparation and characterization of natural deep eutectic solvents (nadess): Application in the extraction of phenolic compounds from araza pulp (eugenia stipitata). *Foods*, 13:1983, 06 2024.

[115] Clara Gomez-Urios, Lorenzo Siroli, Silvia Grassi, Francesca Patrignani, Jesus Blesa, Rosalba Lanciotti, Ana Frigola, Stefania Iametti, María Jose Esteve, and Mattia Nunzio. Sustainable valorization of citrus by-products: natural deep eutectic solvents for bioactive extraction and biological applications of citrus sinensis peel. *European Food Research and Technology*, 251:1965–1980, 05 2025.

[116] Sarwar Beg and Sohail Akhter. Box–behnken designs and their applications in pharmaceutical product development. *Design of experiments for pharmaceutical product development: volume I: basics and fundamental principles*, pages 77–85, 2021.

[117] Antonio Cano, Ana B Maestre, Josefa Hernández-Ruiz, and Marino B Arnao. Abts/tac methodology: Main milestones and recent applications. *Processes*, 11(1):185, 2023.

[118] Maria Do, Socorro Rufino, Ricardo Alves, Edy Brito, Selene Morais, Caroline Sampaio, Jara Pérez-Jiménez, Fulgencio Saura-Calixto, Foto Maria, and Socorro Rufino. Metodologia científica:determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre abts. *Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA)*, 2007.

[119] Yagya Kumari Shrestha and Shree Krishna Shrestha. Fundamentals of colorimetry. In Ashis Kumar Samanta, editor, *Advances in Colorimetry*, chapter 2. IntechOpen, London, 2023.

[120] JDT Kruschwitz. Chapter 61, spectrophotometer components. *Field Guide to Colorimetry and Fundamental Color Modeling*, 2018.

[121] Yasmini Silva, Tânia Ferreira, Guangling Jiao, and Marianne Brooks. Sustainable approach for lycopene extraction from tomato processing by-product using hydrophobic eutectic solvents. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 02 2019.

[122] Susanna Posta, Valeria Gallo, Laura Dugo, Laura De Gara, and Chiara Fanali. Development and box-behnken design optimization of a green extraction method natural deep eutectic solvent-based for phenolic compounds from barley malt rootlets. *ELECTROPHORESIS*, 43, 05 2022.

[123] Ronald Prior, Xianli Wu, and Karen Schaich. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53:4290–302, 06 2005.

[124] Dejian Huang, Boxin Ou, and Ronald Prior. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53:1841–56, 04 2005.

[125] Roberta Re, Nicoletta Pellegrini, Anna Proteggente, Ananth Pannala, Min Yang, and Catherine Rice-Evans. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9):1231–1237, 1999.

[126] Reşat Apak, Mustafa Özyürek, Kubilay Güçlü, and Esra Capanoglu. Antioxidant activity/capacity measurement. 1. classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (et)-based assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 01 2016.

[127] Iris F.F. Benzie and J.J. Strain. The ferric reducing ability of plasma (frap) as a measure of "antioxidant power": The frap assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1):70–76, 1996.

[128] Ümit Erdoğan, Tolga Öztürk, Sercan Önder, and Muhammet Tonguç. Eco-friendly extraction of six different rosemary (rosmarinus officinalis l.) genotypes-using natural deep eutectic solvents: Optimization and modeling via response surface methodology (rsm). *Journal of Molecular Liquids*, 407:125167, 08 2024.

[129] Ebenezer Aluko. Ethanol-based extraction of annatto (bixa orellana l.) and characterization of the bixin and norbixin. *ACS Omega*, 9, 04 2024.

[130] Sonakshi Puri, Sumit Mandal, Harshit Jain, Pankaj Sharma, and Perinkulam Deepa. Comparative bioactivity assessment of bixin pigment and associated phytochemicals extracted from annatto seeds using conventional and green solvents. *Journal of Food and Drug Analysis*, 32:174–189, 06 2024.

[131] Vânia I. B. Castro, Francisca Mano, Rui L. Reis, Alexandre Paiva, and Ana Duarte. Synthesis and physical and thermodynamic properties of lactic acid and malic acid-based natural deep eutectic solvents. *Journal of Chemical Engineering Data*, 63, 06 2018.

[132] Olga Pozharitskaya, Ekaterina Obluchinskaya, Veronika Shikova, Elena Flisyuk, Evgeny Vishnyakov, Elena Makarevich, and Alexander Shikov. Physicochemical and antimicrobial properties of lactic acid-based natural deep eutectic solvents as a function of water content. *Applied Sciences*, 14:10409, 11 2024.

[133] Kornkanok Aryusuk, Piraporn Sombutsuwan, and Erwann Durand. Effect of acidity/alkalinity of deep eutectic solvents on the extraction profiles of phenolics and biomolecules in defatted rice bran extract. *PeerJ Analytical Chemistry*, 6:e29, 01 2024.

[134] Veronika Jančíková, Michal Jablonsky, Katarína Voleková, and Igor Šurina. Summarizing the effect of acidity and water content of deep eutectic solvent-like mixtures—a review. *Energies*, 15:9333, 12 2022.

[135] Diana Rocha, David Freitas, Tarsila Castro, Jennifer Noro, and Carla Silva. Hydration is not detrimental for glycerol:lactic acid deep eutectic mixtures. *Journal of Molecular Liquids*, 391:123249, 10 2023.

[136] Chen Fan, Yang Liu, Sebbah Tarik, and Xueli Cao. A theoretical study on terpene-based natural deep eutectic solvent: Relationship between viscosity and hydrogen-bonding interactions. *Global Challenges*, 5:2000103, 01 2021.

[137] Nerea Rodriguez Rodriguez, Adriaan van den Bruinhorst, Laura Kollau, Maaike Kroon, and Koen Binnemans. Degradation of deep-eutectic solvents based on choline chloride and carboxylic acids. *ACS Sustainable Chemistry Engineering*, 7, 05 2019.

[138] Belén Olivares, Fabián Martínez, Lina Rivas, Cristian Calderón, Jose Munita, and Paola Campodonico. A natural deep eutectic solvent formulated to stabilize -lactam antibiotics. *Scientific Reports*, 8, 10 2018.

[139] Aleksandra Mišan and Milica Pojić. *Applications of NADES in stabilizing food and protecting food compounds against oxidation*, pages 333–359. Academic Press, 10 2020.

[140] Clara Gomez-Urios, Adriana Viñas-Ospino, Pablo Puchades-Colera, Daniel López-Malo, Ana Frigola, María Jose Esteve, and Jesús Blesa. Sustainable development and storage stability of orange by-products extract using natural deep eutectic solvents. *Foods*, 11, 08 2022.

[141] Jennifer Airouyuwa, Hussein Mostafa, Meththa Ranasinghe, and Sajid Maqsood. Influence of physicochemical properties of carboxylic acid-based natural deep eutectic solvents (ca-nades) on extraction and stability of bioactive compounds from date (phoenix dactylifera l.) seeds: An innovative and sustainable extraction technique. *Journal of Molecular Liquids*, 388:122767, 10 2023.

[142] FERREIRA Pupo, TEIXEIRA Otávio, Silvia Moura, and SILVA Souza. Cinética da degradação da cor de solução hidrossolúvel comercial de urucum, submetida a tratamentos térmicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 19, 01 1999.

[143] N Husa, Fazlena Hamzah, and H Said. Characterization and storage stability study of bixin extracted from bixa orellana using organic solvent. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 358:012035, 05 2018.

[144] Hiléia Souza, Nuno Mateus, Victor de Freitas, Maria Gonçalves, and Luis Cruz. Chemical/color stability and rheological properties of cyanidin-3-glucoside in deep

eutectic solvents as a gateway to design task-specific bioactive compounds. *ACS Sustainable Chemistry Engineering*, 43:16184–16196, 11 2020.

[145] Carollyne Maragoni-Santos, Camila Marcolongo Gomes Cortat, Lilia Zago, Stanislau Bogusz Junior, Tatiana Castro Abreu Pinto, Jefferson Santos de Gois, Bianca Chieregato Maniglia, and Ana Elizabeth Cavalcante Fai. Babassu mesocarp-based coating with amazonian plant extracts obtained using natural deep eutectic solvents (nades) for cherry tomato preservation. *Foods*, 15(1), 2026.

[146] Iramaia Neri Numa, Célio Angolini, Juliano Bicas, Ana Ruiz, and Gláucia Pastore. Iridoid blue-based pigments of genipa americana l. (rubiaceae) extract: Influence of ph and temperature on color stability and antioxidant capacity during in vitro simulated digestion. *Food Chemistry*, 263, 05 2018.

[147] Nushrat Yeasmen and Valérie Orsat. Microencapsulation of ultrasound-assisted phenolic extracts of sugar maple leaves: Characterization, in vitro gastrointestinal digestion, and storage stability. *Food Research International*, 182, 02 2024.

[148] Josipa Martinović, Rita Ambrus, Mirela Planinić, Gordana Šelo, Ana-Marija Klarić, Gabriela Perković, and Ana Bucić-Kojić. Microencapsulation of grape pomace extracts with alginate-based coatings by freeze-drying: Release kinetics and in vitro bioaccessibility assessment of phenolic compounds. *Gels*, 10(6), 2024.

[149] Adrian Gordillo-Herrera, Lucia Ventura-Canseco, María Luján-Hidalgo, Claudia Mendoza-Avendaño, Federico Gutiérrez-Miceli, and Miguel Abud-Archila. Effect of encapsulating agent mixtures on the stability and bioaccessibility of b-carotene encapsulated by freeze dryingefecto de las mezclas de agentes encapsulantes en la estabilidad y bioaccesibilidad del b-caroteno encapsulado mediante liofilización. *Biotecnia*, 27:e2454, 01 2025.

[150] Farhad Ahmadi, Hafiz Ansar Rasul Suleria, and Frank Rowland Dunshea. Physicochemical characterization, storage stability behavior, and intestinal bioaccessibility of clove extract encapsulated using varying combinations of gum arabic and maltodextrin. *Foods*, 14, 2025.

[151] Ana Todorović, Luka Šturm, Ana Salevic, Steva Levic, Gasan Osojnik, Iztok Prislan, Mihaela Skrt, Ana Bjeković, Nataša Ulrih, and Viktor Nedović. Encapsulation of

bilberry extract with maltodextrin and gum arabic by freeze-drying: Formulation, characterisation, and storage stability. *Processes*, 10:1991, 10 2022.

[152] Lina Ballesteros, Mónica Ramírez, Carlos Orrego, José Teixeira, and Solange Mussatto. Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. *Food Chemistry*, 237, 05 2017.

[153] Bhagya Raj and Kshirod Dash. Microencapsulation of dragon fruit peel extract by freeze-drying using hydrocolloids: Optimization by hybrid artificial neural network and genetic algorithm. *Food and Bioprocess Technology*, 15:1–15, 09 2022.

[154] Simona Tatasciore, Veronica Santarelli, Lilia Neri, Rodrigo Ortega, Marco Faieta, Carla Di Mattia, Alessandro Di Michele, and Paola Pittia. Freeze-drying microencapsulation of hop extract: Effect of carrier composition on physical, technofunctional, and stability properties. *Antioxidants*, 12:442, 02 2023.

[155] Claudia Giovagnoli-Vicuña, Vilbett Briones-Labarca, Maria Romero, Ady Giordano, and Sebastian Pizarro San Francisco. Effect of extraction methods and in vitro bio-accessibility of microencapsulated lemon extract. *Molecules*, 27:4166, 06 2022.

[156] F. Sefat, G. Farzi, and M. Mozafari. *Principles of Biomaterials Encapsulation: Volume One*. Woodhead Publishing Series in Biomaterials. Elsevier Science, 2022.

[157] Shirish H Sonawane, Bharat A Bhanvase, Manickam Sivakumar, and Shital B Potdar. Current overview of encapsulation. *Encapsulation of active molecules and their delivery system*, pages 1–8, 2020.

[158] Jasmina Tahmaz. Encapsulation and its possible application in the technology of ready-made and ready to eat food - a review. In Muhamed Brka, Enisa Omanović-Mikličanin, Jasmin Grahić, Samir Muhamedagić, Alen Mujčinović, Almir Toroman, and Vedad Falan, editors, *32nd Scientific-Expert Conference of Agriculture and Food Industry*, pages 335–350. Springer Nature Switzerland, 2023.

[159] Seid-Mahdi Jafari, Katayoun Mahdavi-Khazaei, and Abbas Hemmati-Kakhki. Microencapsulation of saffron petal anthocyanins with cress seed gum compared with arabic gum through freeze drying. *Carbohydrate Polymers*, 140:20–25, 2016.

[160] K. Mahdavee Khazaei, S.M. Jafari, M. Ghorbani, and A. Hemmati Kakhki. Application of maltodextrin and gum arabic in microencapsulation of saffron petal's anthocyanins and evaluating their storage stability and color. *Carbohydrate Polymers*, 105:57–62, 2014.

[161] Lorena Silva Pinho, Bhavesh K. Patel, Osvaldo H. Campanella, Christianne Elisabete da Costa Rodrigues, and Carmen Sílvia Favaro-Trindade. Microencapsulation of carotenoid-rich extract from guaraná peels and study of microparticle functionality through incorporation into an oatmeal paste. *Foods*, 12(6), 2023.

[162] Emanuele Joana Gbur Laureanti, Thainnane Silva Paiva, Luiz Mário de Matos Jorge, and Regina Maria Matos Jorge. Microencapsulation of bioactive compound extracts using maltodextrin and gum arabic by spray and freeze-drying techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253:126969, 2023.

[163] Christine A Butts, John A Monro, and Paul J Moughan. In vitro determination of dietary protein and amino acid digestibility for humans. *British Journal of Nutrition*, 108(S2):S282–S287, 2012.

[164] R Zijlstra, Prajwal Regmi, L Wang, and Rajesh Jha. In vitro techniques to describe energy digestibility and kinetics of carbohydrate degradation of feedstuffs in pigs. *Computerized Journal of Pig Production*, 18:174–176, 01 2011.

[165] Reşat Apak, Kubilay Güçlü, Birsen Demirata, Mustafa Özyürek, S. Karademir Çelik, Burcu Bektaşoğlu, K. Berker, and Dilek Özyurt. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the cuprac assay. *Molecules*, 12:1496–1547, 07 2007.