



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



KALIL ARAÚJO DA SILVA

**Otimização da extração de antocianinas de *Hibiscus sabdariffa*
L. via solventes eutéticos profundos naturais (NADES) para a
obtenção de um hidrogel de HPMC**

MANAUS-AM

2026



KALIL ARAÚJO DA SILVA

**Otimização da extração de antocianinas de *Hibiscus sabdariffa* L.
via solventes eutéticos profundos naturais (NADES) para a
obtenção de um hidrogel de HPMC**

Dissertação de Mestrado apresentada para
obtenção do título de Mestre em Ciência e
Engenharia de Materiais, do Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais
da Universidade Federal do Amazonas.

Orientador(a): Prof. Dr. Edgar Aparecido Sanches

MANAUS-AM

2026

Ficha Catalográfica

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

-
- S586o Silva, Kalil Araújo da
 Otimização da extração de antocianinas de Hibiscus sabdariffa L.
 via solventes eutéticos profundos naturais (NADES) para a
 obtenção de um hidrogel de HPMC / Kalil Araújo da Silva. - 2026.
 115 f. : il., color. ; 31 cm.
- Orientador(a): Edgar Aparecido Sanches.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas,
 Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de
 Materiais, Manaus, 2026.
1. Hibiscus sabdariffa. 2. antocianinas. 3. NADES. 4. hidrogel. 5.
 entrega de medicamentos. I. Sanches, Edgar Aparecido. II.
 Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação
 em Ciência e Engenharia de Materiais. III. Título
-

KALIL ARAÚJO DA SILVA

**Otimização da extração de antocianinas de *Hibiscus sabdariffa* L.
via solventes eutéticos profundos naturais (NADES) para a
obtenção de um hidrogel de HPMC**

Dissertação de Mestrado apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais, do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal do Amazonas.

Aprovado em: 29/05/2026.

Banca:

Prof. Dr. Edgar Aparecido Sanches
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar (Presidente)

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

Prof.^a Dr.^a Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria
Universidade Federal do Amazonas – UFAM (Membro)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela iluminação e sustento durante a empreitada acadêmica. Pela saúde que me deu para continuar na lida com os experimentos e rotinas da pós-graduação, ainda que algumas vezes isso me tenha faltado no caminho. Obrigado por nunca me deixar esquecer o Senhor é o *summum bonum*, a própria vida, que fui em tudo e em todos.

À minha família, meus pais Felicicimo e Kellen, e meus irmãos mais novos, por nunca permitirem que eu me afastasse do caminho da educação e que sempre me incentivaram a galgar novos caminhos e desafios. Obrigado pelo apoio e suporte, ainda que silencioso, mas presente, que me possibilitou chegar até aqui e caminhar para a próxima etapa.

À minha noiva, Cecília, por todo o carinho, cuidado e compaixão inefavelmente dirigido a mim neste processo. Obrigado por muitas vezes compartilhar o peso dessa rotina e dos fracassos, e por me ajudar a melhorar como pesquisador e pessoa neste tempo.

A meu orientador, Dr. Edgar Sanches, por toda a confiança, orientação, incentivo e dedicação à esta pesquisa, sem a qual, muito dela não seria possível. Obrigado por me mostrar como melhorar e refinar o caminho que trilho na pesquisa.

À Josiana Moreira Mar, amiga e mãe científica, que me ensinou quase tudo o que sei fazer em bancada e me foi tão fundamental no começo da carreira acadêmica e continua sendo. Obrigado por sempre me ajudar quando não consigo achar saída nos meus experimentos, ou quando ainda não conheço alternativas que possam me ajudar de uma melhor maneira e por sempre me indicar os caminhos seguros e pessoas em que posso confiar.

A Adriano Carolino, amigo e praticamente coorientador dessa pesquisa. Esse trabalho nunca teria avançado sem sua ajuda, crítica e direcionamento. Obrigado por estar sempre disposto a ajudar até com coisas mais simples que não conhecia e por toda a parceria e escuta nos meus momentos de reclamação rsrsrs Te devo um Adolpho!

À Dr^a. Keyla Ramos pelo acolhimento e apoio na etapa mais crucial desta pesquisa. Obrigado por todo o cuidado, atenção e preocupação nestes meses em que estivemos juntos queimando pestana para resolver cada nova descoberta (ou

problema rsrsrs) que tivemos. E à toda equipe debaixo de sua coordenação no Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutica – LCQF/UFAM.

À meus queridos amigos e colegas da UFAM, Célio Macalia, Ronald Nunes, Jamilton Boaz, e toda a equipe do Laboratório de Polímeros Nanoestruturados (NANOPOL) pelas conversas e convivência na rotina do laboratório. Vocês tornaram as coisas muito mais fáceis de lidar. Obrigado por cada momento compartilhado e pelos momentos de discussão dos resultados, que foram tão fundamentais.

A Daniel Rocha, Júlio Nino e toda a equipe do Laboratório de Caracterização e Purificação de Biomoléculas do Centro de Apoio Multidisciplinar pelo apoio nas caracterizações químicas.

Ao Laboratório de Atividade Biológica e o Grupo de Pesquisa BioPHAR pelo suporte para a realização do teste de segurança farmacêutico.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas – FAPEAM pela bolsa de fomento

À CAPES e CNPq pela estrutura de laboratório.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPGCEM) pela estrutura e participação no progresso acadêmico por mim realizado durante o mestrado.

*O começo de todas as ciências é o espanto
de as coisas serem o que são.*

Aristóteles

RESUMO

As antocianinas de *Hibiscus sabdariffa* L. apresentam reconhecida atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana, mas sua instabilidade química frente a variações de pH, temperatura e oxigênio limita sua aplicação. Este trabalho teve por objetivo otimizar a extração dessas antocianinas por Solventes Eutéticos Profundos Naturais (NADES) e empregá-las na obtenção, caracterização e avaliação de segurança de um hidrogel de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) como sistema de liberação. Sete sistemas eutéticos foram triados por extração assistida por ultrassom, adotando-se o teor de antocianinas totais como critério de seleção. O sistema ácido láctico:glicerol:ácido cítrico (LAT:GLY:CIT) apresentou o maior teor (10,63 mg/mL) e elevada atividade antioxidante, sendo selecionado para otimização por planejamento Box-Behnken e metodologia de superfície de resposta. A análise dos dados revelaram que o tempo de sonicação foi o fator mais significativo; a condição ótima (270 W, 20–50 °C, 15 min) forneceu 6,52 mg/mL, com robustez térmica entre 20 e 50 °C. A caracterização por UPLC-QToF-MS/MS e HPLC-DAD identificou a delphinidina-3-O-sambubiosídeo e a cianidina-3-O-sambubiosídeo como antocianinas majoritárias, enquanto o FTIR evidenciou a integração dos pigmentos à rede de ligações de hidrogênio do NADES. O extrato eutético reteve 72,6% das antocianinas após 28 dias à temperatura ambiente, valor superior ao observado para a extração controle que obteve 36,0%. Quatro hidrogéis de HPMC a 3% foram desenvolvidos, apresentando densidade próxima à da água e espalhabilidade compatível com formas tópicas, na qual o extrato/NADES atuou como plastificante. As formulações contendo NADES exibiram pH favorável à estabilização do cátion flavílio, e o ensaio preliminar HET-CAM indicou ausência de irritabilidade das formulações em gel. Os resultados demonstram que o sistema LAT:GLY:CIT apresenta como uma plataforma verde eficiente para a extração, estabilização e veiculação tópica de antocianinas em matriz de HPMC.

Palavras-chave: *Hibiscus sabdariffa*; antocianinas; NADES; hidrogel; HPMC; entrega de medicamentos

ABSTRACT

The anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. are known for their antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial activity, but their chemical instability in the presence of pH, temperature, and oxygen limits their application. The objective of this study was to optimize the extraction of these anthocyanins using Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) and to employ them in the preparation, characterization, and safety evaluation of a hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) hydrogel as a delivery system. Seven eutectic systems were screened by ultrasound-assisted extraction, using total anthocyanin content as the selection criterion. The lactic acid:glycerol:citric acid (LAT:GLY:CIT) system exhibited the highest content (10.63 mg/mL) and high antioxidant activity, and was selected for optimization using Box-Behnken design and response surface methodology, in which sonication time was the most significant factor; the optimal condition (270 W, 20–50 °C, 15 min) yielded 6.52 mg/mL, with thermal robustness between 20 and 50 °C. Characterization by UPLC-QToF-MS/MS and HPLC-DAD identified delphinidin-3-O-sambubioside and cyanidin-3-O-sambubioside as the major anthocyanins, while FTIR revealed the integration of the pigments into the NADES hydrogen-bond network. The eutectic extract retained 72.6% of the anthocyanins after 28 days at room temperature, compared to 36.0% for the ethanolic extract. Four 3% HPMC hydrogels were developed, exhibiting a density close to that of water and spreadability compatible with topical formulations, in which the extract/NADES acted as a plasticizer. The formulations containing NADES exhibited a pH favorable for the stabilization of the flavyl cation, and the preliminary HET-CAM assay indicated no irritation from the gel formulations. The results demonstrate that the LAT:GLY:CIT system constitutes an efficient green platform for the extraction, stabilization, and topical delivery of anthocyanins in an HPMC matrix.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa*; anthocyanins; NADES; hydrogel; HPMC; drug delivery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via Fenton/Haber-Weiss	16
Figura 2: Síntese de polifenóis em plantas induzidas por estresse	20
Figura 3: Estrutura química das antocianinas mais comuns e algumas fontes	25
Figura 4: Estrutura do íon flavílio, antocianidinas, posições dos radicais e nomenclatura das antocianinas	26
Figura 5: Estrutura dos compostos majoritários dos cálices de hibisco	28
Figura 6: Diagrama de fase para formação de um sistema eutético binário	29
Figura 7: Estruturas de vários componentes de NADES	31
Figura 8: Representação do hipercubo do Box-Behnken	34
Figura 9: Estrutura da HPMC	37
Figura 10: Gráfico Q-Q dos resíduos	63
Figura 11: Resíduos padronizados	63
Figura 12: Resíduos vs Valores ajustados	64
Figura 13: Perfil cromatográfico obtido por UPLC-QToF-MS/MS (modo ESI ⁺) do extrato NADES de H. sabdariffa	68
Figura 14: Perfil de aquisição MSe por UPLC-QToF-MS/MS (modo ESI ⁺) do extrato NADES de H. sabdariffa	69
Figura 15: Espectros de massas de alta resolução obtidos por UPLC-QToF-MS/MS (modo ESI ⁺) da Delphinidina 3-O-sambubiosídeo identificada em extrato NADES de H. sabdariffa	70
Figura 16: Espectros de massas de alta resolução obtidos por UPLC-QToF-MS/MS (modo ESI ⁺) da Cianidina 3-O-sambubiosídeo identificada em extrato NADES de H. sabdariffa	71
Figura 17: Cromatograma obtido por HPLC-DAD (520 nm) do extrato NADES de H. sabdariffa	74
Figura 18: Espectros de absorção UV-Vis obtidos pelo detector de arranjo de diodos (DAD) para os picos majoritários do extrato NADES de H. sabdariffa	75
Figura 19: Espectro de FTIR do NADES e do extrato NADES de H. sabdariffa	78
Figura 20: Preparação do teste de espalhabilidade	89
Figura 21: Aferição do diâmetro do gel após acomodação sob carga	90
Figura 22: Gráfico de espalhabilidade dos géis de HPMC	91
Figura 23: Teste de HET-CAM do NADES (SVTL), do extrato NADES de H. sabdariffa (EHBC) em diferentes concentrações e das formulações GP1 (GSEX) e GP2 (FHBC)	95

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	14
3. REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1. RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO's)	15
3.2. SISTEMAS ANTIOXIDANTES CELULARES	17
3.3. ANTOCIANINAS (ACN)	23
3.4. HIBISCO	27
3.5. SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS (<i>Deep Eutectic Solvents</i> - DES).....	28
3.5.1. SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NATURAIS E EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM.....	30
3.6. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	32
3.7. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE COMPOSTOS BIOATIVOS .	34
3.7.1. HIDROGÉIS.....	34
3.7.1.1. MECANISMOS DE LIBERAÇÃO DE HIDROGÉIS.....	35
3.7.1.2. APLICAÇÕES DOS HIDROGÉIS.....	36
3.7.2. HIDROGÉIS À BASE DE HIDROXIPROPILMETILCELULOSE (HPMC)....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1. MATERIAL VEGETAL.....	41
4.2. PREPARAÇÃO DOS NADES	42
4.3. TRIAGEM DOS NADES.....	43
4.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH, ABTS, FRAP, FENÓIS TOTAIS E ANTOCIANINAS TOTAIS)	43
4.4.1. DPPH	43
4.4.2. FRAP	44
4.4.3. FENÓIS TOTAIS.....	44
4.4.4. ANTOCIANINAS TOTAIS	44
4.5. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL (<i>DoE</i> = <i>Design of Experiments</i>)	45
4.5.1. BOX-BEHNKEN.....	45
4.5.2. METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (<i>RSM</i> = <i>Response Surface Methodology</i>)	46
4.6. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA AMOSTRA	47
4.6.1. Análise por UPLC-QToF-MS/MS	47
4.6.2. ANÁLISE POR HPLC-DAD.....	48
4.6.3. ESPECTROMETRIA FTIR.....	49

4.7. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO HIDROGEL DE HPMC	49
4.7.1. CARACTERIZAÇÃO DO HIDROGEL DE HPMC.....	50
4.7.3. DENSIDADE	50
4.7.4. TESTE DE ESPALHABILIDADE.....	51
4.7.5. HET-CAM.....	52
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1. OBTENÇÃO DOS NADES	53
5.2. TRIAGEM DOS NADES.....	54
5.2.1. TEOR DE ANTOCIANINAS TOTAIS	54
5.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	56
5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ANTIOXIDANTES	58
5.4.1. DPPH	59
5.4.3. ANTOCIANINAS TOTAIS	59
5.4.4. FENÓIS TOTAIS	60
5.5. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO POR PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN E METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.....	60
5.5.1. Ajuste do Modelo Polinomial Quadrático	61
5.5.2. Análise de Variância (ANOVA)	61
5.5.3. Diagnóstico do Modelo.....	62
5.5.4. Análise das Interações e da Topologia da Superfície de Resposta	64
5.5.5. Predição e Validação Experimental dos Pontos Ótimos	66
5.5.6. Definição das Condições Operacionais Ótimas	67
5.6. Caracterização Química.....	68
5.6.1. UPLC-QToF-MS/MS	68
5.6.2. Identificação Estrutural pelo Espectro de Massas	69
5.6.2.1. Pico 1 – Delfinidina-3-O-sambubiosídeo	69
5.6.2.2. Pico 2 – Cianidina-3-O-sambubiosídeo	70
5.6.2.3. Precisão de Massa e Confiabilidade	71
5.6.2.4. Valor Diagnóstico do Padrão de Fragmentação	72
5.6.2.5. Implicações para a Extração por NADES	72
5.6.3. Análise por HPLC-DAD	73
5.6.4. Espectrometria FTIR.....	77
5.7. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO HIDROGEL.....	80
5.7.1. pH	80
5.7.2. Densidade.....	85

5.7.3. Teste de Espalhabilidade.....	88
5.7.4. HET-CAM.....	94
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
Material suplementar.....	113
S2. DPPH	113
S3. FRAP	114
S4. Antocianinas totais	115
S5. Fenóis totais	116

1. INTRODUÇÃO

O hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) é um arbusto bienal, ou seja, uma planta que completa seu ciclo biológico em dois anos (24 meses ou oito estações). Seus cálices são utilizados para preparar uma infusão aquosa de sabor levemente ácido e adstringente. Entre os principais produtores comerciais dessa espécie estão países de clima tropical e subtropical, como Sudão, Tailândia, China, México, Egito, Senegal e Tanzânia. No Brasil, o cultivo ocorre em estados como Paraná, Rio Grande do Sul, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul e Goiás, mas a comercialização ainda se restringe principalmente a mercados locais e regionais [1, 2, 3].

O hibisco possui diversas propriedades benéficas, incluindo ação antibacteriana, antioxidante, hepatoprotetora, diurética, reguladora da saciedade, moduladora do metabolismo lipídico (efeito anticolesterol), antidiabética e anti-hipertensiva. Esses efeitos estão associados à sua alta capacidade antioxidante, inibição enzimática e atividade vasorrelaxante. Esses efeitos podem ser atribuídos à presença de compostos bioativos, como ácidos fenólicos (ex.: ácido protocatecuico), ácidos orgânicos (ácido hidroxicítrico e ácido hibisco) e antocianinas (delfinidina-3-sambubiosídeo e cianidina-3-sambubiosídeo), que atuam sinergicamente em diferentes vias metabólicas [4, 5, 6].

As antocianinas são pigmentos hidrossolúveis que conferem coloração a frutas e vegetais. Seu estudo tem crescido devido ao duplo potencial: como antioxidantes com benefícios à saúde e como substitutos naturais para corantes sintéticos na indústria de alimentos [7, 8, 10]. Esses compostos fenólicos, integrantes da dieta humana, apresentam propriedades biológicas multifacetadas, incluindo potente atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral. Tais efeitos estão associados à capacidade desses fitoquímicos de modular vias metabólicas e neutralizar espécies reativas de oxigênio, contribuindo para a prevenção de doenças crônicas não transmissíveis [7].

Entretanto, as antocianinas são quimicamente instáveis, podendo sofrer alteração na presença de oxigênio, altas temperaturas, variação de pH, enzimas, copigmentos, íons metálicos, dióxido de enxofre, açúcar e produtos de degradação do açúcar [11, 12, 13].

Há um crescente interesse em métodos de extração de compostos bioativos que sejam menos agressivos ao meio ambiente. Dentre eles, os Solventes Eutéticos

Profundos Naturais (do inglês *Natural Deep Eutectic Solvents* – NADES), tem recebido muita notoriedade como alternativa aos solventes orgânicos, por possuírem baixo custo, baixa toxicidade, boa degradabilidade, não-inflamáveis e de propriedades reguláveis. Os NADES já tem sido utilizados para extração de antocianinas e tem se mostrado promissores [7, 8, 9, 10].

Nesse contexto, os NADES também oferecem uma solução tecnológica para proteger antocianinas, devido a sua capacidade de formar uma rede supramolecular forte que fornece estabilidade e proteção à moléculas, preservando assim suas propriedades funcionais [12, 13]

Portanto, para que essas moléculas estabilizadas no sistema eutético possam ser efetivamente empregadas com fins terapêuticos, é necessário incorporá-las a um veículo capaz de conciliar a manutenção da estabilidade química com a liberação controlada do ativo no sítio de ação. Nesse contexto, os hidrogéis poliméricos destacam-se como sistemas de *drug delivery* versáteis: retêm elevado teor de água em uma rede tridimensional, oferecendo um microambiente compatível com biomoléculas hidrossolúveis como as antocianinas e permitindo modular o perfil de liberação por difusão, intumescimento e erosão da matriz. Entre os polímeros disponíveis, a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) é um derivado celulósico semissintético, não iônico e biocompatível, amplamente utilizado na farmacotécnica, que forma géis claros, de espalhabilidade agradável e comportamento pseudoplástico, sendo empregado tanto em formas tópicas quanto em sistemas de liberação modificada. Além disso o fato de que a associação entre NADES e matrizes celulósicas origina os chamados eutectogéis, nos quais o solvente eutético atua simultaneamente como meio de solubilização, agente plastificante e estabilizante do pigmento, integrando-se à rede de ligações de hidrogênio do polímero e ampliando as possibilidades de *design* da formulação.

Diante disso, e considerando as atividades biológicas das antocianinas de *H. sabdariffa*, bem como a necessidade de protegê-las e veiculá-las de forma adequada, o presente trabalho propõe a otimização da extração desses pigmentos por NADES e seu emprego na obtenção, caracterização e avaliação da segurança de um hidrogel de HPMC como sistema de liberação.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Otimizar a extração de antocianinas de *Hibiscus sabdariffa* L. via solventes eutéticos profundos naturais (NADES) e obtenção, caracterização e teste de segurança de um hidrogel de HPMC.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a extração de antocianinas de *Hibiscus sabdariffa* L. via solventes eutéticos profundos naturais (NADES)
- Caracterizar quimicamente o extrato otimizado por HPLC-DAD e espectrometria de massas, identificando e quantificando as antocianinas majoritárias
- Avaliar a estabilidade do teor de antocianinas do sistema otimizado à temperatura ambiente por 28 dias;
- Obter e caracterizar hidrogéis de HPMC incorporados com o sistema eutético de hibisco
- Avaliar o potencial irritante dos hidrogéis e do extrato NADES por meio do ensaio HET-CAM, observando alterações vasculares como hemorragia, lise e coagulação na membrana corioalantóica

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO's)

O oxigênio é fundamental para a vida dos organismos aeróbicos. Sua utilização permitiu que seres humanos e animais metabolizassem gorduras, proteínas e carboidratos para produzir energia. Contudo, o oxigênio também contribui para o envelhecimento e o surgimento de doenças. Durante o metabolismo celular, a produção de energia através de reações redox gera radicais livres [14, 15].

Radicais livres são moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada de valência, o que os tornam instáveis, de vida curta e altamente reativos. Essa característica é responsável por desencadear reações em cadeia. Os radicais livres buscam se ligar a outras moléculas, átomos ou elétrons isolados para formar um composto estável. Eles atuam como agentes oxidantes ou redutores, doando ou capturando um elétron de outras moléculas [14].

Dentre os radicais livres, as espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) se destacam. Elas incluem três espécies químicas da via

Além disso, em níveis controlados, as ERO's são moléculas necessárias para o funcionamento do organismo. A mitocôndria é uma das principais produtoras de ERO's no organismo. Além dela, peroxissomos, retículo endoplasmático, células fagocíticas e neutrófilos na corrente sanguínea também produzem ERO's [16].

Figura 1: Via Fenton/Haber-Weiss



A alta concentração de ERO's no organismo pode resultar em degradação dos componentes celulares ou ativa vias de sinalização específicas para a remoção de ERO's antes de causar danos às células. Além disso, as ERO's também estão relacionadas com o envelhecimento, a quebra na dupla fita de DNA, câncer, inflamação crônica, doenças hepáticas, renais, pulmonares, cardiovasculares, neurológicas e artrite reumatoide [14, 16, 17].

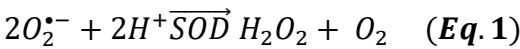
3.2. SISTEMAS ANTIOXIDANTES CELULARES

O interesse científico pelos antioxidantes surgiu inicialmente no contexto industrial, voltado à prevenção da oxidação de gorduras insaturadas e ao controle do ranço em alimentos. Com o avanço das pesquisas bioquímicas e a identificação das vitaminas C, E e A como constituintes endógenos dos organismos vivos, a compreensão sobre o papel dos antioxidantes expandiu-se significativamente, transcendendo a aplicação tecnológica e passando a abranger sua função essencial na manutenção da homeostase celular e na proteção dos tecidos biológicos

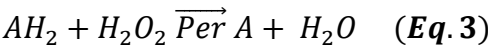
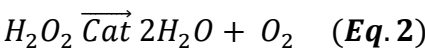
O organismo possui mecanismos para controlar as concentrações de espécies reativas de oxigênio. Estes mecanismos são baseados na atuação de compostos antioxidantes. Halliwell define antioxidante como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com o substrato oxidável, retarda ou impede a oxidação desse substrato. Estes compostos são capazes de prevenir, interceptar ou reparar o efeito dos compostos oxidantes, transformando-os em água e protegendo as células dos danos decorrentes da elevada concentração de EROs [18].

O sistema antioxidante presente no organismo é dividido em enzimático e não-enzimático. Entre eles existem diferentes tipos de compostos com diferentes atuações. Eles podem atuar como sinergistas de quelantes, inibidores de enzimas, sequestradores ou decompositores de radical e doadores de hidrogênio. Os antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos existem no ambiente extra e intracelular para desintoxicar as ERO's. Eles atuam com dois principais mecanismos de ação: O primeiro é a quebra da cadeia, na qual os antioxidantes primários doam um elétron aos radicais livres, enquanto o segundo direciona a remoção dos iniciadores de espécies reativas (antioxidantes secundários) ao extinguir o catalisador que inicia a cadeia de reação. [16]

A enzima superóxido dismutase (SOD) realiza a remoção de $O_2^{\bullet-}$ transformando-o em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (**Eq. 1**).



A catalase é uma enzima, presente exclusivamente nos peroxissomos, que possui papel duplo: a decomposição de peróxido de hidrogênio, o que auxilia na diminuição da formação do radical hidroxila pela reação de Fenton e uma função peroxidante para oxidar uma variedade de doadores de H, como demonstrado em **Eq. 2** e **Eq. 3**



A glutathiona peroxidase atua reduzindo o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular assim como reduz outras espécies de peróxidos a água ou álcool. A glutathiona reduzida é um cofator da família da glutathiona peroxidase que auxilia contra o estresse oxidativo sendo oxidada a dissulfeto de glutathiona (GSSG). A coenzima Q desempenha função na cadeia transportadora de elétrons, diminui o grau de oxidação das proteínas de membrana. Quando está na sua forma antioxidante, ubiquinol, ela inibe a iniciação da lipoperoxidação e regenera a vitamina E [15, 16,17]. A função dos antioxidantes enzimáticos está organizada na **Tabela 1**.

Tabela 1: Antioxidantes enzimáticos e suas funções

ANTIOXIDANTE	FUNÇÃO
Superóxido Dismutase (SOD)	Dismuta $O_2^{\bullet-}$ com uma alta taxa de reação por sucessiva redução e oxidação de metais de transição para H_2O_2 .
Catalase (Cat)	Dismuta H_2O_2 em H_2O e O_2
Glutathiona Peroxidase (GPx)	Diminui a peroxidação lipídica, diminui H_2O_2 a presença de glutathiona tripeptideo, GPx acidiona dois elétrons para realizar a redução de peróxidos

Fonte: Adaptado de CHAUDHARY et al, 2023 [16].

Os antioxidantes não-enzimáticos, por exemplo as vitaminas E, C e A, são compostos exógenos, adquiridos durante a alimentação, e desempenham um papel de apoio na manutenção da homeostase. Eles eliminam os radicais livres e as espécies reativas doando um elétron e mantendo um equilíbrio químico. Esses agentes dietéticos saturam-se facilmente, apenas uma vez, quando doam o elétron

A vitamina E (α tocoferol) possui um importante papel na quebra de reação em cadeia em humanos, interrompe a peroxidação lipídica e sequestra diretamente espécies reativas, incluindo $\bullet\text{OH}$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ e $^1\text{O}_2$ [16, 17].

A vitamina C, ou ácido ascórbico, é um sequestrador hidrofílico de radicais oxigênio. Atua restringindo o processo carcinogênico de diversos compostos nitrosos e é um potente sequestrador e agente redutor de espécies reativas, protegendo proteínas e a membrana lipídica de danos [15,17].

A vitamina A, ou β -caroteno, é um importante antioxidante pois interfere no processo de peroxidação. Possui a habilidade de neutralizar e capturar certos tipos de radicais livres orgânicos e neutralizar espécies reativas de oxigênio presentes na forma excitada [15, 16] A função dos antioxidantes não-enzimáticos está apresentada do **Tabela 2**:

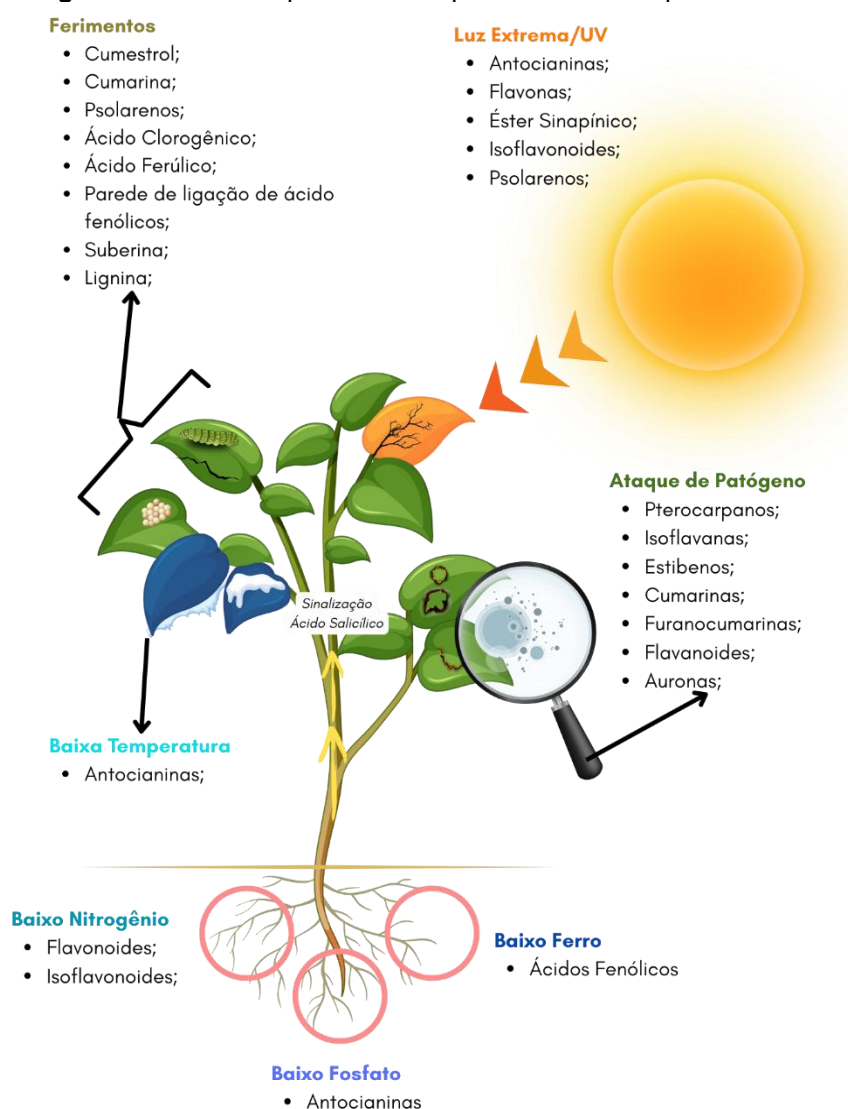
Tabela 2: Antioxidantes não-enzimáticos.

ANTIOXIDANTE	FUNÇÃO
	Antioxidante de ligações da membrana mais abundante.
Vitamina E (α-tocoferol)	Reduz a peroxidação lipídica ao sequestrar os radicais $\bullet\text{OH}$, $\text{O}_2^{\bullet-}$. Interrompe as reações em cadeia dos radicais livres capturando esses radicais.
Vitamina A (β-caroteno)	Sequestra os radicais peróxidos $\bullet\text{OH}$, $\text{O}_2^{\bullet-}$. Reduz a oxidação da vitamina A.
Vitamina C (Ácido Ascórbico)	Reduz os radicais $\bullet\text{OH}$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 ; neutraliza oxidantes obtidos por neutrófilos estimulados. Aumenta a concentração de vitamina E.

Fonte: Adaptado de CHAUDHARY et al, 2023 [16].

Compostos fenólicos, ou polifenóis, são moléculas produzidas pelo metabolismo secundário das plantas. Eles não participam da fitossíntese fundamental ou do metabolismo respiratório, mas atuam nos mecanismos de defesa em resposta a estresse biótico e abiótico. Alguns estressores abióticos podem alterar o ambiente e torná-lo prejudicial para o crescimento e desenvolvimento da planta. Alguns deles são: água (seca ou enchente), metais pesados, salinidade, temperaturas extremas (congelamento ou resfriamento), níveis de luminosidade (baixa ou alta), radiação (UV-A e UV-B), ozônio, dióxido de enxofre, e fatores mecânicos, conforme apresentado na **Figura 2** [20, 21].

Figura 2: Síntese de polifenóis em plantas induzidas por estresse



Fonte: Adaptado de Saini et al, 2024 [20].

Na indústria alimentícia, os polifenóis são usados para manipular a adstringência, o amargor, o sabor, a cor, o odor e a estabilidade oxidativa. Posteriormente, diversas pesquisas epidemiológicas e meta-análises reforçaram a importância da proteção oferecida pela ingestão prolongada de polifenóis vegetais na dieta diária, destacando seus benefícios na prevenção do desenvolvimento de diabetes, câncer, osteoporose, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas. Esses estudos recomendam enfaticamente a inclusão desses compostos na alimentação regular como uma estratégia eficaz para promover a saúde e reduzir o risco de diversas doenças crônicas [22].

Estruturalmente, esses compostos são formados por um ou mais anéis aromáticos ligados a um ou mais grupos hidroxila, e isso confere diversas estruturas químicas para esses compostos. E sua classificação se dá por suas diferenças estruturais. Os compostos fenólicos são divididos em várias subclasses, como: ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, cumarinas, lignanas, quinonas, estilbenos e curcuminóides [20, 22]. As classes, subclasses e alguns exemplos de compostos fenólicos estão apresentadas no **Tabela 3**.

Tabela 3: Diferentes tipos de compostos fenólicos.

COMPOSTOS FENÓLICOS		
CLASSE	SUBCLASSE	EXEMPLOS
Flavonoides	Flavonóis	Quercetina
		Kaempferol
		Miricetina
	Flavonas	Luteolina
		Apigenina
		Naringenina
	Flavononas	Hesperetina
		Catequina
		Epicatequina
	Antocianinas	Cianidina
		Delfinidina
		Perlagonidina
		Petunidina

Ácidos Fenólicos	Ácidos Hidroxibenzóicos	Malvidina Peonidina Ácido Gálico Ácido Elágico Ácido Protocatecuico Ácido Cafeico
	Ácidos Hidroxicinâmicos	Ácido Ferúlico Ácido Clorogênico
		Cis e Transresveratrol
	Resveratrol	Pterostilbeno Piceatanol
		Secoisolariciresinol
Lignanas	Secoisolariciresinol	diglucósídeo
		Enterolignanas
	Matairesinol	Matairesinol
Taninos		Enterolignanas
	Taninos Hidrolisáveis	Galotaninos
		Elagitaninos
	Taninos Condensados (Proantocianidinas)	Procianidinas Prodelfinidinas
Curcuminóides		Dimetoxicurcumina
	Curcuminas	Ciclocurcumina
		Hidroxicurcumina
Isoflavonóides	-	Genisteína
	-	Daidzeína
Ligninas		Guaiacil
	-	Siringil
		p-Hidroxifenil lignina
Cumarinas		Cumarina
	-	(1,2-benzopirona) e seus derivados
Glicosídeos Fenólicos	-	Salicina (produto do ácido salicílico)

Fonte: Adaptado de Saini et al, 2024 [20].

3.3.ANTOCIANINAS (ACN)

Antocianinas (do grego *anthos* — flor e *kianos* — azul) pertencem à classe dos flavonoides e constituem o pigmento mais importante das plantas vasculares, sendo responsáveis pelas colorações laranja, rosa, vermelho, violeta e azul brilhantes observadas em flores, frutos e outros órgãos vegetais. Nos organismos vegetais, essas moléculas desempenham funções ecológicas diversas e complementares: quando sintetizadas nas pétalas, atuam na atração de polinizadores; nas sementes e frutos, participam da dispersão vegetal; e, de forma mais ampla, exercem papel defensivo contra herbivoria e radiação UV, contribuindo para a sobrevivência da planta em diferentes condições ambientais [23].

Para além de suas funções biológicas nos vegetais, as antocianinas apresentam relevância direta para aplicações humanas. Na indústria alimentícia, destacam-se tanto pela capacidade de conferir coloração característica a produtos como o vinho tinto, quanto pelo potencial como corantes naturais seguros, sem efeitos adversos conhecidos. Do ponto de vista funcional, sua potente atividade antioxidante sustenta uma ampla gama de benefícios à saúde, incluindo proteção cardiovascular, neuroproteção, modulação imunológica, melhora da saúde intestinal e efeitos anti-inflamatórios, antiobesidade, antidiabéticos, antienvelhecimento e antitumorais. [23, 24, 25].

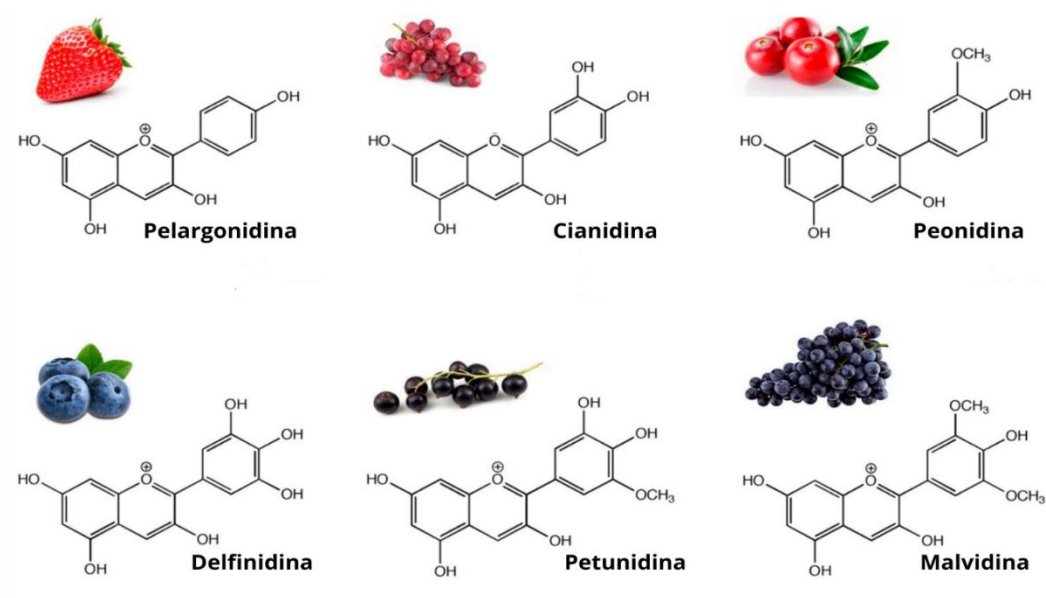
Quimicamente, antocianinas são produtos glicosilados de antocianidinas, que são produtos oxigenados do cátion 2-fenilbenzopirílio (flavílio), que possui dois anéis benzênicos, separados por um anel heterocíclico oxigenado, um anel pirílico, criando a estrutura molecular C6-C3-C6. As antocianinas possuem um resíduo de açúcar ligado a uma antocianidina na posição C3 da aglicona por uma ligação α ou β glicosídica. Se houver resíduos de açúcar adicionais na molécula de antocianina, eles são ligados nas posições C5 e C7 e, com menos frequência, nas posições C3' e C5'. Esses resíduos de açúcar normalmente são glicose, galactose, rhamnose, arabinose ou xilose. Essa glicosilação converte a antocianidina (forma mais instável) para antocianina (forma mais estável). Liu e colaboradores [26] reportaram que tanto glicosilação quanto acilação contribuem para a diversidade de antocianinas e de suas cores. No entanto, as antocianinas são propensas à degradação devido à presença

de muitos grupos hidroxila fenólicos instáveis em sua estrutura. Fatores como pH, temperatura, luz, oxigênio, enzimas, solventes, íons metálicos e proteínas, podem afetar a estabilidade das antocianinas [24, 25, 27, 28, 29].

Em meio ácido (pH entre 1 e 2), as antocianinas apresentam coloração intensamente avermelhada, o que corresponde ao equilíbrio entre o cátion flavílio e uma estrutura conhecida como pseudobase carbinol. Com o aumento do pH, as antocianinas vão perdendo a cor até um pH aproximadamente 6, devido à formação da pseudobase carbinol. Em pH entre 6,5 e 8, ocorre a formação de estruturas que apresentam coloração violeta, as anidrobases. Em pH acima de 8, ocorre a ionização das antocianinas, de modo que, entre pH 9 e 12, formam-se anidrobases que exibem coloração azul. Para valores de pH acima de 9, pode ocorrer a ruptura do anel heterocíclico, com a formação de estruturas conhecidas como chalconas. Após a abertura do anel, as mudanças são consideradas irreversíveis, tornando bastante difícil a observação de estruturas presentes em pH abaixo de 9, como o cátion flavílio. [25, 29]

Koss-Mikołajczyk e Bartoszek [28] reportaram que mais de 1000 moléculas de antocianinas estruturalmente distintas e 27 antocianidinas com diferentes estruturas foram identificadas. Entretanto, apenas 6 antocianidinas são encontradas em aproximadamente 90% da natureza. São elas: cianidina, pelargonidina, delphinidina, malvidina, peonina e petunidina (**Figura 3**). Elas são diferenciadas por suas estruturas químicas, na mudança do número e da posição diferentes dos grupos metoxi e hidroxila na estrutura do íon flavílio (**Figura 4**).

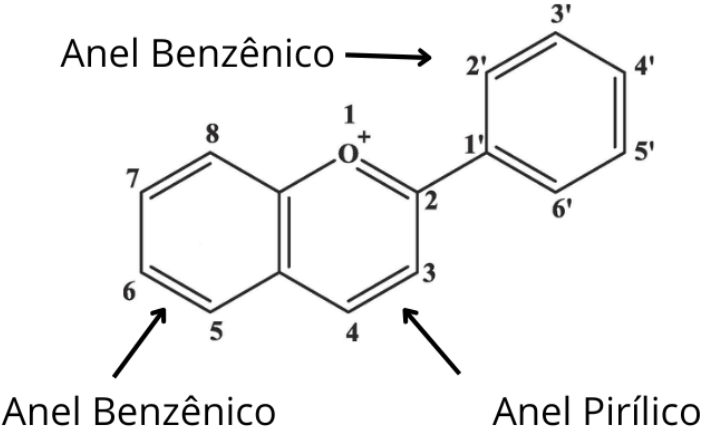
Figura 3: Estrutura química das antocianinas mais comuns e algumas fontes



Fonte: KOSS-MIKOŁAJCZYK; BARTOSZEK, 2023 [28].

As principais fontes de antocianinas são plantas (27 famílias e 73 gêneros) como morango, mirtilo, uvas, tomates, açaí, berinjela, jenipapo e hibisco.

Figura 4: Estrutura do íon flavílio, antocianidinas, posições dos radicais e nomenclatura das antocianinas



NOMECLATURA SEGUNDO A ESTRUTURA QUÍMICA

- Cianidina-3-O-glicosídeo
- Cianidina-3,5-O-diglicosídeo
- Definidina-3-O-glicosídeo
- Perlagonidina-3-O-glicosídeo
- Malvidina-3-O-glicosídeo
- Malvidina-3,5-O-diglicosídeo

ANTOCIANIDINAS MAIS COMUNS E AS POSIÇÕES DOS SEUS RADICAIS

ANTOCIANIDINAS	COR	R(C3)	R(C5)	R(C6)	R(C7)	R(C3')	R(C4')	R(C5')
CIANIDINA	MAGENTA	OH	OH	H	OH	OH	OH	H
DELFINIDINA	ROXO/AZUL	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH
PELARGONIDINA	VERMELHA	OH	OH	H	OH	H	OH	H
MALVIDINA	ROXO	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃
PEONIDINA	MAGENTA	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	H
PETUNIDINA	ROXO	OH	OH	H	OH	OH	OH	OCH ₃

ANTOCIANIDINAS MENOS COMUNS E AS POSIÇÕES DOS SEUS RADICAIS

ANTOCIANIDINAS	R(C3)	R(C5)	R(C6)	R(C7)	R(C3')	R(C4')	R(C5')
APIGENIDINA	H	OH	H	OH	H	OH	H
CRISINA	H	OH	H	OH	H	H	H
QUERCETAGETINIDINA	OH	OH	OH	OH	H	OH	OH

Fonte: Adaptado de SADOWSKA-BARTHOSZ; BARTHOSZ, 2024 [23]

3.4. HIBISCO

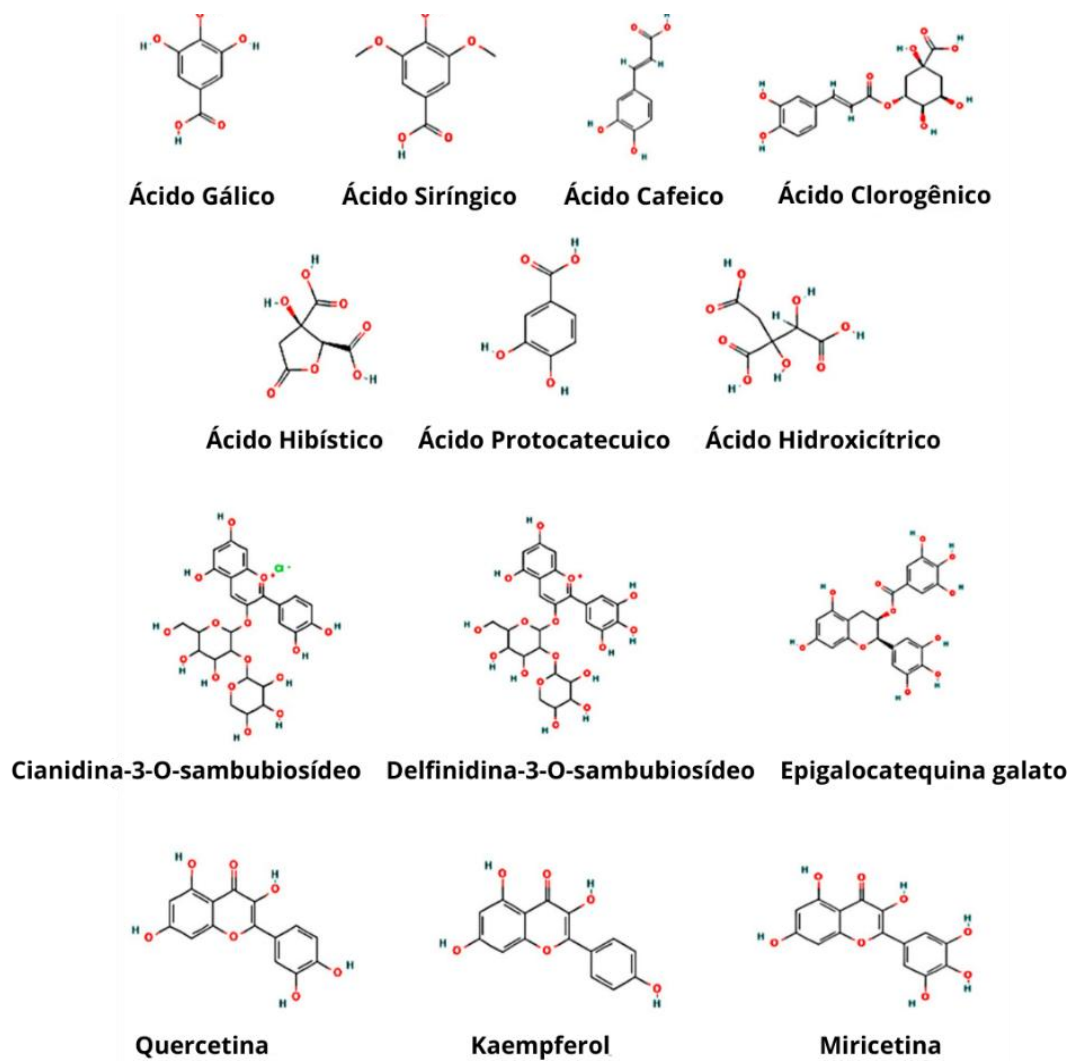
Hibiscus sabdariffa L. é uma espécie pertencente à família Malvaceae. O gênero *Hibiscus* corresponde a mais de 300 espécies de ervas arbustos ou árvores anuais ou perenes. Também conhecida como hibisco, karkade, roselle, Jamaica, *red sorrel*, *indian sorrel*, wonjo, chá azedo, groselha, azedinha, caruru-azedo, é nativa da Índia e Malásia, mas é cultivada ao redor do mundo em regiões tropicais e subtropicais. É um arbusto anual bastante difundido e consumido no Oeste e Sul da África e Sudeste Asiático. Ela tem sido utilizada na medicina tradicional a milhares de anos e é normalmente consumida como chá ao redor do mundo [30, 31, 32].

O hibisco é fonte de diversos compostos bioativos como polifenóis, carotenóides, ácido ascórbico, e taninos. Essa composição pode variar de acordo com a parte da planta utilizada, fatores climáticos, maturidade da planta e diferenças de genótipos. Além disso, ela também é utilizada como pigmento natural utilizado na indústria alimentícia e têxtil [31, 32].

Devido aos compostos bioativos presentes, várias atividades biológicas relacionadas ao uso ou consumo de hibisco têm sido reportadas, como: anticâncer, antiespasmódica, antifúngica, antiparasitária, antibacteriana, antipirética, anti-inflamatória, antinociceptiva, neuro e hepatoprotetora, além de efeitos anti-hipertensivos. Essas atividades são atribuídas à presença de diversos constituintes fitoquímicos como mineirais (Ca, Fe e Mg), vitaminas (ácido ascórbico), fibras solúveis e insolúveis, antocianinas (delfinidina-3-O-sambubiosídeo e cianidina-3-O-sambubiosídeo), flavonóides (quercetina, kaempferol, luteolin e apigenina), ácidos fenólicos (ácido clorogênico e protocateuico) e ácidos orgânicos (ácido cítrico e ácido hibístico) [31].

Os cálices de hibisco ganham destaque por serem uma fonte rica em ácido gálico, ácido siríngico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido hibístico, ácido protocateuico, ácido hidroxicítrico, cianidina-3-sambibiosídeo, delfinidina-3-sambubiosídeo, epigallocatequina galato, quercetina, kaempferol e miricetina. As estruturas dos majoritários dos cálices estão apresentadas na **Figura 5** [33].

Figura 5: Estrutura dos compostos majoritários dos cálices de hibisco



Fonte: MONTALVO-GONZÁLEZ et al, 2022 [33].

3.5. SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS (*Deep Eutectic Solvents - DES*)

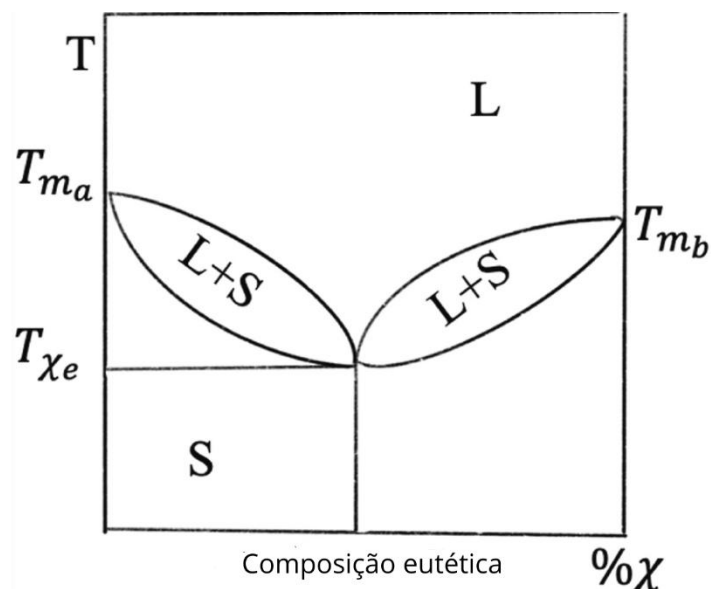
Na última década houve uma busca por novos solventes que fossem ecologicamente corretos, biodegradáveis, de baixa ou nenhuma toxicidade, de baixo custo em relação aos solventes tradicionais e não-inflamáveis [34].

Assim, em 2003, Abbot [35] publica sua pesquisa sobre Líquidos Iônicos (LI), na qual sugere uma nova classe dentro desses solventes: Os Solventes Eutéticos Profundos (do inglês, *Deep Eutectic Solvents – DES*). Essa nova classe de solventes é sintetizada a partir de complexação entre determinadas proporções molares de um sal orgânico com um ou mais doador de hidrogênio. A complexação geralmente ocorre

entre dois componentes, o sal orgânico (sal de amina quaternária) atua como aceptor de hidrogênio (HBA, do inglês, *Hydrogen Bond Aceptor*), e compostos orgânicos (amidas, ácidos carboxílicos, álcoois e carboidratos) atuam como doadores de hidrogênio (HBD, do inglês, *Hydrogen Bond Donor*) [36].

Na formação desses solventes, ocorre um fenômeno característico de abaixamento do ponto de fusão em consequência da deslocalização de cargas. Quando a complexação é concluída, a interação entre os grupos aniônicos e catiônicos é enfraquecida pelas ligações de hidrogênio formada entre o HBD e os ânions durante a complexação, reduzindo a força de Coulomb na rede do sistema. As ligações de hidrogênio formadas interferem na capacidade de cristalização dos compostos iniciais e na entropia do sistema, o que acarreta na diminuição do ponto de fusão (abaixo do ponto de fusão dos componentes), formando um eutético (**Figura 6**), e a formação de uma fase líquida à temperatura ambiente [36].

Figura 6: Diagrama de fase para formação de um sistema eutético binário



Fonte: KOH et al, 2023 [37]

No diagrama é possível observar que os componentes “a” e “b” separados possuem temperaturas de fusão mais altas que a mistura, logo eles não interagem entre si. Contudo, no ponto de composição eutética, a temperatura de fusão dos sólidos diminui, o que resulta em uma mistura líquida homogênea de a+b. Por exemplo, um DES composto de cloreto de colina e uréia possui temperatura de fusão

em 12°C, enquanto seus componentes possuem as temperaturas de fusão individuais de 302 e 133°C respectivamente [38].

O tipo de HBD e proporção molar utilizados influenciam em diversas propriedades. A viscosidade pode ser ajustável ao variar as proporções molares de HBA e HBD. A alta viscosidade desses solventes pode ser atribuída à rede de ligações de hidrogênio que limitam a mobilidade da estrutura supramolecular e dificultando a transferência de massa. Dependendo da aplicação, solventes com viscosidades muito altas não são desejáveis. Esses solventes são conhecidos por serem adaptáveis em suas características como, pH, densidade, polaridade condutividade para atingir o objetivo desejado [38, 39].

3.5.1. SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NATURAIS E EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

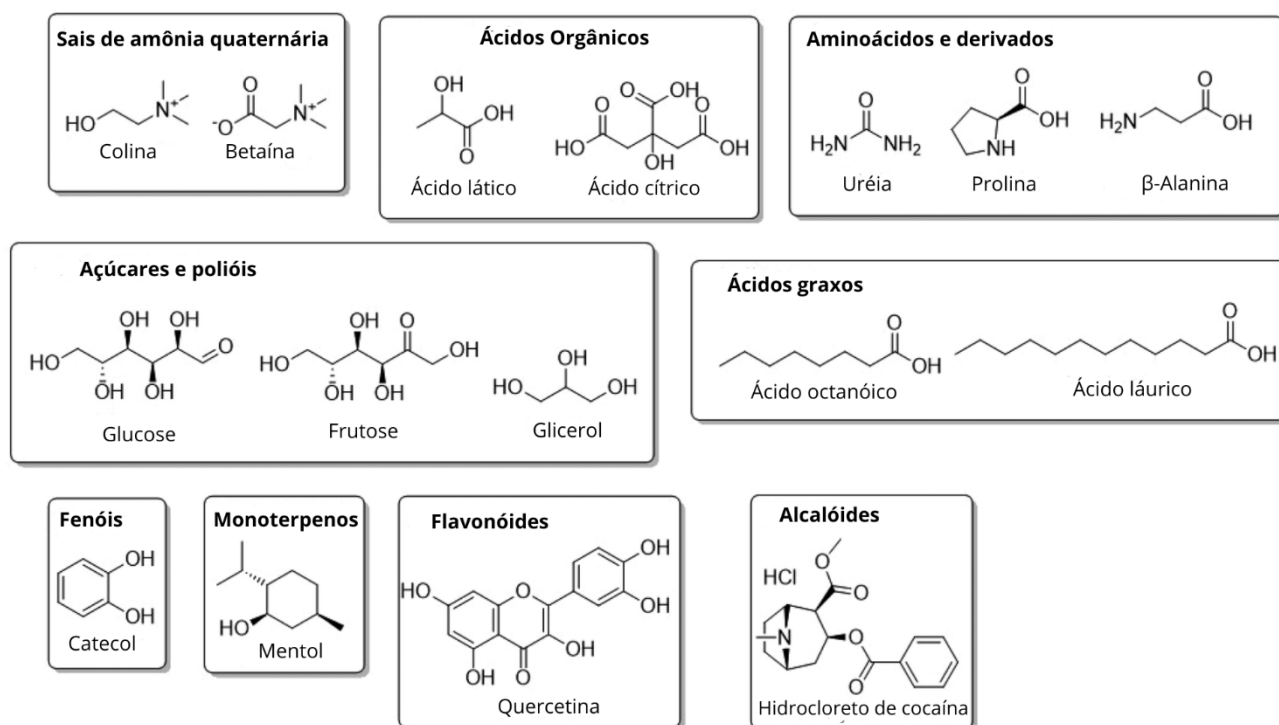
Quando um DES é formado de moléculas naturais é chamado de Solvente Eutético Profundo Natural (NADES, do inglês, *Natural Deep Eutectic Solvent*). Choi e colaboradores [40] foram os primeiros a perceber o papel do NADES na metabolômica das plantas. Os NADES estão presentes em organismos vivos assumindo funções biológicas como alternativa a água.

Os NADES são tipicamente compostos por pelo menos dois componentes, geralmente envolvendo um ácido e uma base de Brønsted ou de Lewis. A maioria dos NaDES descritos até o momento consiste em metabólitos "primários" ou biossinteticamente primordiais (PRIM), que podem ser agrupados em cinco categorias principais com base em sua natureza química: compostos de amônio quaternário, ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares e ácidos graxos. As estruturas das moléculas de cada categoria estão apresentadas na **Figura 7**.

Os NADES têm sido utilizados como solvente para extração de compostos bioativos e os resultados obtidos são promissores. Os NADES oferecem uma ampla gama de polaridades, o que os torna versáteis para a extração de compostos polares e não polares, sendo aplicados com sucesso na extração de diversos metabólitos de biomassa vegetal, animal, fúngica e bacteriana [40-42].

A extração de antocianinas utilizando NADES também tem demonstrado resultados satisfatórios. Zannou e colaboradores [8] obtiveram maior teor de antocianinas (10,62mg de delfinidina-3-O-sambubiosídeo(D3S)/g) na amostra de extração eutética que as amostras de extração convencional (água destilada - 6,44mg D3S/g, etanol 70% - 6,80mg D3S/g, metanol 80% - 5,68mg D3S/g). Outros estudos envolvendo extração por NADES também obtiveram resultados positivos na extração de antocianinas e outros polifenóis [9,10,43-60].

Figura 7: Estruturas de vários componentes de NADES



Fonte: CHEVÉ-KOOLS et al, 2025.

Além disso, a extração por NADES tem sido associada a outras técnicas para melhorar e otimizar a extração. Uma dessas associações é a extração assistida por ultrassom (UAE, do inglês, *Ultrasound assisted Extaction*). Ela ganhou destaque como uma técnica ecológica, eficiente em termos energéticos e aumenta o rendimento e a qualidade dos compostos bioativos, oferecendo vantagens como processamento mais rápido, uso reduzido de solventes e menor consumo de energia. A UAE foi associada aos NADES como uma alternativa visando transpor a barreira das altas viscosidades características dos eutéticos. Durante a UAE, os solventes devem não apenas

dissolver os compostos bioativos de forma eficiente, mas também possuir características físicas (por exemplo, viscosidade, tensão superficial, pressão de vapor) que aumentem a dinâmica da cavitação, afetando assim a eficiência da extração. Logo, a formação de bolhas pela cavitação enfraquece as ligações de hidrogênio, aumentando a transferência de massa. Então, a UAE rompe as estruturas celulares das plantas, pela cavitação, acelerando a liberação de compostos bioativos [61, 62].

3.6. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A Metodologia de Superfície de Resposta (RSM, do inglês, *Response Surface Methodology*) é uma abordagem matemática e estatística amplamente empregada para modelar e analisar processos nos quais a resposta desejada é influenciada por múltiplos fatores, visando otimizar a resposta. O método tem se destacado por sua eficiência, pois considera tanto os efeitos principais quanto as interações entre variáveis, requerendo um número reduzido de experimentos para elucidar a relação causal entre os fatores e as respostas. [63, 64]

O método unifatorial é uma abordagem clássica para problemas de otimização, que avalia o efeito de uma única variável enquanto mantém as demais constantes. Para obter as condições ideais, esse processo deve ser repetido para cada variável individualmente. No entanto, a principal limitação desse método é que ele não considera as interações entre as variáveis analisadas, impossibilitando a avaliação do efeito combinado de todos os fatores no processo. Além disso, a abordagem unifatorial exige um maior número de experimentos, aumentando significativamente o tempo e os custos envolvidos na pesquisa. Por isso, os métodos de otimização multivariada têm sido preferidos, pois permitem a análise simultânea de múltiplas variáveis, sendo mais rápidos, econômicos e eficientes em comparação com abordagens unifatoriais [64].

A RSM, modelos matemáticos são construídos a partir de dados experimentais para estabelecer as relações entre variáveis independentes (fatores) e variáveis dependentes (respostas). Esses modelos permitem avaliar os efeitos individuais e as interações entre os fatores sobre as respostas, além de otimizar o processo em estudo. A aplicação do RSM como ferramenta de otimização segue um procedimento sistemático composto por múltiplas etapas [65].

1. Seleção das variáveis independentes e seus intervalos;
2. Selecionar o planejamento experimental e conduzir os experimentos;
3. Criar um modelo de regressão com base nos resultados experimentais;
4. Verificar a adequação do modelo;
5. Representação gráfica do modelo e obtenção das condições ideais.

A equação geral da RSM (**Eq.4**) pode ser de primeira, segunda, terceira ordem ou de ordens mais altas. Ela busca explicar diferentes termos do modelo correspondentes ao grau de interações entre os níveis dos fatores [66].

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \epsilon \quad (\text{Eq. 4})$$

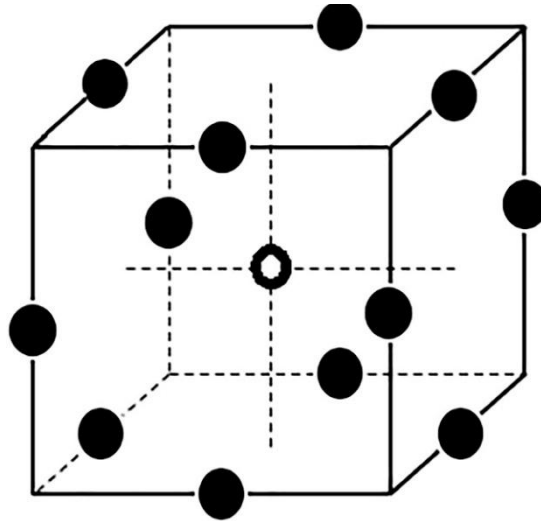
Onde, Y é a variável dependente (resposta), X_i e X_j são variáveis independentes (fatores), β_0 é o coeficiente constante (intercepto), β_i , β_{ii} e β_{ij} são os coeficientes lineares, quadráticos e de interação entre os fatores X_i e X_j respectivamente, e ϵ é o erro aleatório.

Um dos planejamentos experimentais mais comuns a serem utilizados em modelagem de superfície de resposta é o design experimental Box-Behnken (BBD, do inglês, *Box-Behnken Design*). Desenvolvido por George Box e Donald Behnken em 1960, é um planejamento de segunda ordem rotacionáveis ou quase rotacionáveis baseado em designs fatoriais incompletos de três níveis. Esse procedimento cria projetos com propriedades estatísticas desejáveis, mas, o que é mais importante, com apenas uma fração dos experimentos necessários para um fatorial de três níveis. Como há apenas três níveis, o modelo quadrático é apropriado. Um projeto Box-Behnken é uma alternativa econômica ao projeto composto central. Dessa forma, ele supera as dificuldades inerentes aos projetos compostos centrais, em que cada fator precisa ser estudado em cinco níveis, aumentando, conseqüentemente, o número de n experimentos com o aumento do número de fatores. Uma das vantagens do BBD é que ele não contém combinações em que todos os fatores estejam nos níveis mais altos ou mais baixos ao mesmo tempo, portanto, nesse caso, não é necessário realizar medições em situações extremas (os vértices do cubo). O número de experimentos requeridos pelo design Box-Behnken é apresentado na **Eq. 5** e a representação gráfica do Box-Behnken está apresentada na **Figura 8** [63, 66].

$$N = 2k(k - 1) + C_0 \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde k é o número de fatores e C_0 é o número de compostos centrais.

Figura 8: Representação do hipercubo do Box-Behnken



Fonte: Szpisják-Gulyás et al, 2023 [63]

3.7. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Os sistemas de liberação controlada de compostos bioativos têm sido amplamente estudados nas últimas décadas como estratégia para manter concentrações terapêuticas ou funcionais adequadas ao longo do tempo, reduzir efeitos adversos e proteger moléculas sensíveis contra processos de degradação física, química ou enzimática. Esses sistemas desempenham um importante papel na melhoria da biodisponibilidade e na estabilidade durante processamento, armazenamento e distribuição, além de possibilitar roteiros de liberação espacialmente dirigidos [67].

3.7.1. HIDROGÉIS

Hidrogéis são definidos como redes tridimensionais de polímeros hidrofílicos reticulados, capazes de absorver grandes quantidades de água sem se dissolver, formando estruturas macias e altamente hidratadas que mimetizam, em certa medida, o ambiente aquoso dos tecidos biológicos. Esses sistemas se destacam por serem plataformas versáteis para o controle da cinética e da localização da liberação de substâncias ativas. Esses sistemas são adequados para a liberação de controlada de

compostos bioativos por suas características de intumescimento, biocompatibilidade e possibilidade de ajustar parâmetros como porosidade, tamanho de malha, densidade de reticulação, carga e hidrofobicidade. [68, 69]

Esses materiais podem ser classificados em função da origem dos polímeros (naturais, sintéticos ou híbridos), do tipo de reticulação (física vs covalente), da responsividade a estímulos (pH, temperatura, redox, luz, campos elétricos ou magnéticos) e da carga global (aniônicos, catiônicos, anfóteros ou neutros). Em hidrogéis formados por polissacarídeos, proteínas ou derivados de celulose, as interações de ligação de hidrogênio e eletrostáticas têm papel central na formação e estabilização da rede, enquanto em sistemas sintéticos, ligações covalentes geradas por polimerização ou são frequentemente utilizadas para construir redes com arquitetura mais bem definida. [69, 70]

3.7.1.1. MECANISMOS DE LIBERAÇÃO DE HIDROGÉIS

A liberação de compostos a partir de hidrogéis é tradicionalmente descrita por três regimes principais: transporte difusional (Fickiano), transporte anômalo e liberação controlada por erosão ou degradação. No regime difusional, a matriz permanece estruturalmente estável e a quantidade liberada é proporcional à raiz quadrada do tempo, comportamento que pode ser descrito por modelos clássicos como o de Higuchi. Em muitos sistemas farmacêuticos, especialmente aqueles em que o intumescimento e a relaxação da rede ocorrem em escalas de tempo comparáveis à difusão do soluto, observa-se um transporte anômalo, intermediário entre difusional e erosivo, que pode ser descrito por equações empíricas como as de Korsmeyer–Peppas, com expoentes característicos que indicam a natureza dominante do processo. [70, 71]

Quando a rede é biodegradável ou contém ligações covalentes suscetíveis à hidrólise, oxidação ou clivagem enzimática, a liberação pode ser dominada por erosão ou degradação, de modo que a taxa de liberação se torna fortemente dependente da cinética de quebra de ligações e de perda de massa da matriz. A literatura indica ainda o avanço de hidrogéis “inteligentes”, que incorporam segmentos ou pontos de reticulação responsivos a múltiplos estímulos, permitindo perfis de liberação cuidadosamente reguláveis e, em alguns casos, reversíveis mediante aplicação de estímulos externos. Hidrogéis híbridos nanopartícula–hidrogel, nos quais

nanopartículas lipídicas, inorgânicas ou poliméricas funcionam como domínios de armazenamento ou como nós de reticulação, têm demonstrado benefícios em termos de estabilidade da carga, possibilidade de encapsular moléculas hidrofóbicas e modulação da difusividade aparente dos bioativos. [68, 69, 70, 72, 73]

3.7.1.2. APLICAÇÕES DOS HIDROGÉIS

As aplicações de hidrogéis como sistemas de liberação controlada abrangem formas farmacêuticas orais, injetáveis, tópicas, transdérmicas e implantes para terapia localizada. Um panorama geral publicado em *Gels* descreve o uso de hidrogéis poliméricos na liberação de pequenas moléculas, proteínas, ácidos nucleicos, células e vesículas extracelulares, bem como em engenharia de tecidos e medicina regenerativa. Dessa forma, hidrogéis podem atuar simultaneamente como reservatórios de fatores bioativos e como arcabouços para adesão, proliferação e diferenciação celular, sendo particularmente relevantes hidrogéis injetáveis que gelificam *in situ* por diferenças de temperatura, pH ou composição iônica entre a formulação e o ambiente fisiológico. [68, 73]

Em dermatologia e cosmecêutica, a revisão publicada em *Pharmaceutics* destaca a importância de hidrogéis como veículos para antibióticos tópicos, anti-inflamatórios, antioxidantes e agentes antiacne, ressaltando o conforto do paciente, a redução de efeitos sistêmicos e a possibilidade de controle de liberação na interface pele–formulação. Na área de alimentos, artigos em periódicos da Elsevier como *Journal of Agriculture and Food Research* e *Advances in Food and Nutrition Research* apontam o uso de hidrogéis biopoliméricos como partículas estruturais e sistemas de encapsulação para bioativos em bebidas, produtos lácteos e matrizes semissólidas, com foco na estabilidade durante processamento e na liberação modulada no trato gastrointestinal. Esses sistemas buscam compatibilizar requisitos sensoriais, regulatórios e de processamento com o controle da cinética e do local de liberação dos compostos bioativos. [69, 74, 75]

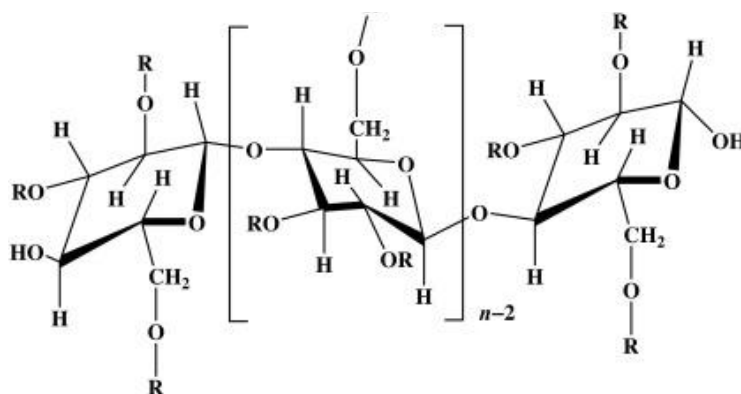
3.7.2. HIDROGÉIS À BASE DE HIDROXIPROPILMETILCELULOSE (HPMC)

Os hidrogéis constituem redes poliméricas tridimensionais altamente hidratadas, capazes de absorver grandes quantidades de água sem se dissolver [77]. Essa característica os torna materiais de grande interesse para aplicações biomédicas, especialmente em sistemas de liberação controlada de fármacos e

compostos bioativos [78,79]. Dentre os polímeros utilizados para a formação de hidrogéis, a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) ocupa posição de destaque por reunir biocompatibilidade, versatilidade reológica e estabilidade química em ampla faixa de pH [80].

A hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), **Figura 9**, é um éter de celulose não iônico, obtido por metilação e hidroxipropilação dos grupos hidroxila da celulose, o que resulta em uma macromolécula solúvel em água fria, com comportamento termogelificante e disponível em uma ampla gama de graus de substituição e viscosidade [76].

Figura 9: Estrutura da HPMC



Fonte: Deshmukh et. al., 2017 [84]

A fórmula geral do HPMC é $C_6H_7O_2(OH)_x(OCH_3)_y(OC_3H_7)_z$, onde $x + y + z = 3$, sendo x o número de grupos hidroxila livres remanescentes, y o número de grupos metoxila e z o número de grupos hidroxipropila por unidade AGU [81]. O número CAS do HPMC é 9004-65-3 e sua massa molar varia de aproximadamente 10.000 a 1.500.000 g/mol, dependendo do grau de polimerização [80].

A eterificação dos grupos hidroxila da celulose interrompe a extensa rede de ligações de hidrogênio inter e intramolecular responsável pela insolubilidade do biopolímero nativo [82]. Os substituintes introduzidos, especialmente os grupos hidroxipropila, impedem o empacotamento cristalino das cadeias, permitindo a solvatação em água à temperatura ambiente [82,39].

O procedimento padrão para dissolução do HPMC consiste em dispersar o pó em água quente (70–90°C), onde as partículas do polímero se hidratam e intumescem, seguido de resfriamento para obtenção de solução transparente e

homogênea [83]. Essa estratégia evita a formação de grumos, pois em temperaturas elevadas a gelificação ainda não ocorreu. O HPMC é também solúvel em solventes dipolares apróticos, como dimetilsulfóxido (DMSO) [83]. Em solução aquosa, o HPMC forma géis estáveis em pH de 3 a 11, sem alterações significativas em suas propriedades reológicas ou de transparência [80].

Os hidrogéis físicos de HPMC são formados pela associação não-covalente de cadeias poliméricas em solução aquosa por meio de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio [81,82]. O mecanismo aceito na literatura contemporânea envolve duas etapas sequenciais: (1) separação de fases, induzida pelo aquecimento acima da temperatura de agregação (T_{agr}), nas quais regiões ricas em polímero se formam por desolvatação dos grupos hidrofóbicos; e (2) formação e entrelaçamento de fibrilas a partir da fase rica em polímero, resultando na rede tridimensional do hidrogel [81,85].

O caráter reversível desses géis, retornando à fase sol por resfriamento, é consequência direta da natureza física (não-covalente) das interações que os sustentam [81]. Essa reversibilidade é uma vantagem significativa para aplicações farmacêuticas, pois permite a preparação e o processamento do hidrogel a temperatura ambiente e sua transição para gel *in situ* após administração, sob temperatura corporal [79].

A aplicação mais consolidada dos hidrogéis de HPMC é no sistema de liberação oral de fármacos. Matrizes de HPMC formam um gel viscoso em contato com os fluidos gastrointestinais, criando uma barreira de difusão que retarda a liberação do princípio ativo [80,82]. O grau de retardamento é proporcional à viscosidade do HPMC empregado: graus K15M e K100M sustentam a liberação por 12 a 24 horas, enquanto graus K4M mantêm a liberação por até 12 horas [80].

A difusão do composto ativo a partir de matrizes de HPMC é modulada pela combinação de três mecanismos: (1) difusão do fármaco através do gel formado pela hidratação das cadeias poliméricas; (2) erosão da matriz polimérica por dissolução gradual; e (3) relaxação polimérica, que amplia os poros da rede [78,79]. A contribuição relativa de cada mecanismo depende das propriedades físico-químicas do fármaco, da concentração de HPMC e das condições do meio [79,81].

Em formulações tópicas, o HPMC atua como agente gelificante em concentrações de 1 a 4% (m/v), formando géis neutros, transparentes e de agradável

espalhabilidade [82,86]. Sua natureza não iônica reduz o risco de irritação cutânea e melhora a compatibilidade com ampla gama de ativos [86]. Pan *et al.* desenvolveram hidrogéis bioadesivos HPMC/PVP com prolongada retenção cutânea e perfil de liberação sustentada, avaliando a influência de variáveis de formulação (concentração de HPMC, razão HPMC/PVP) sobre as propriedades fisicomecânicas, reológicas e bioadesivas dos sistemas [86].

A incorporação de Solventes Eutéticos Profundos Naturais (NADES) em formulações de hidrogéis à base de polímeros de celulose representa uma estratégia emergente de grande interesse tecnológico e farmacêutico. Esses géis formados a partir dessa combinação NADES-Polímeros são denominados eutectogéis, são materiais iônicos macios constituídos por um solvente eutético imobilizado em uma estrutura de rede tridimensional, herdando as propriedades intrínsecas dos DES (baixa pressão de vapor, facilidade de preparação, condutividade iônica, compatibilidade ambiental e custo reduzido) e adquirindo propriedades adicionais derivadas da estrutura gel, como capacidade de autocura, adesividade e propriedades antibacterianas ajustáveis pela seleção dos componentes da mistura eutética [89]. Nicolau, Mutch e Thickett [90] complementam essa definição ao esclarecer que os eutectogéis poliméricos podem ser preparados substituindo o solvente convencional por um DES na síntese da rede polimérica, ou incorporando monômeros que participam diretamente da composição do DES, resultando em materiais com alta resistência adesiva, viscosidade ajustável, rápida cinética de polimerização e elevada flexibilidade. Kichou *et al.* [87] demonstraram que a adição de 10% (m/m) de dois NADES hidrofílicos: betaína/glicerol e ácido cítrico/glicose a hidrogéis de carboximetilcelulose (CMC) para uso cosmético promoveu aumento significativo da viscosidade em repouso e modificou o comportamento reológico do sistema, exibindo pseudoplasticidade pronunciada, ao mesmo tempo em que a calorimetria diferencial de varredura (DSC) evidenciou a supressão do pico endotérmico associado ao afrouxamento das cadeias de CMC, sugerindo interações moleculares de ligação de hidrogênio entre o NADES e a matriz polimérica. No campo farmacêutico, Hasanpour *et al.* [88] desenvolveram hidrogéis de HPMC contendo um NADES de cloreto de colina/ácido cítrico para solubilizar e potencializar a permeação dérmica da base de lidocaína, demonstrando por espectroscopia Raman e RMN que novas interações moleculares entre o fármaco e os componentes do NADES foram estabelecidas

dentro da matriz do hidrogel, com impacto positivo na estabilidade e na eficiência biofarmacêutica da formulação. Villa et al. [83] contextualizam que, no campo biomédico, os NADES podem atuar como modificadores de biopolímeros e como sistemas de entrega terapêutica (*therapeutic deep eutectic systems*), sendo capazes de solubilizar e estabilizar diferentes formulações galênicas em matrizes de celulose, o que amplia consideravelmente as possibilidades de design de hidrogéis funcionais para drug delivery.

No contexto específico dos polímeros de celulose, Shaw et al. [91] desenvolveram um eutectogel de cloreto de colina/glicerol-celulose capaz de carrear múltiplos agentes antimicrobianos, nanopartículas de prata, flocos de fósforo negro e fármacos comerciais (octenidina, tetraciclina e fluconazol), demonstrando redução superior a 97% no crescimento de *S. aureus* resistente à metilicina, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Xu et al. [92] elaboraram um eutectogel à base de hidroxietilcelulose (HEC) e DES de N-metilacetamida/LiTFSI, obtendo condutividade iônica de $2,04 \times 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ a 30°C por meio de canais de condução dual estabelecidos pelas cadeias de HEC e pela fase DES, além de propriedades de autocura e retardamento de chamas. Para o HPMC especificamente, Kumar et al. [93] desenvolveram um eutectogel bioadesivo (BAEgel) combinando alginato de sódio, HPMC K15 e um DES de cloreto de colina/propilenoglicol para a liberação transdérmica do antifúngico eberconazol, demonstrando que a adição de HPMC aumenta a viscosidade do gel e estabiliza a matriz eutética, prevenindo a lixiviação do solvente e proporcionando liberação controlada do fármaco ao longo do tempo; os autores concluíram que a combinação das propriedades gelificantes do alginato com a capacidade de sustentação da liberação do HPMC resulta em um sistema sinérgico de elevado desempenho bioadesivo e biocompatibilidade. Zhang et al. [94] situam o surgimento dos eutectogéis como uma solução para as principais limitações dos hidrogéis convencionais, congelamento em baixas temperaturas, volatilização em altas temperaturas e vazamento de solvente orgânico, posicionando esses materiais como a próxima geração de géis condutores e multifuncionais para eletrônica flexível e sistemas biomédicos.

Além disso, as aplicações dos eutectogéis abrangem um espectro amplo e diversificado de áreas tecnológicas e biomédicas, reflexo direto de suas propriedades ajustáveis e da versatilidade dos solventes eutéticos que os constituem. Hu et al [95]

apresentam uma revisão abrangente das aplicações biomédicas dos eutectogéis, destacando seu potencial em sistemas de *drug delivery* para melhorar a estabilidade de fármacos e possibilitar a liberação de precisão com redução de efeitos colaterais, bem como sua utilização em engenharia de tecidos, biossensores e bioadesivos. Nicolau et al [90] sistematizam as aplicações dos eutectogéis poliméricos em cinco grandes domínios: (1) eletrônica orgânica e filmes luminescentes; (2) eletrólitos para dispositivos de armazenamento de energia (baterias e supercapacitores de estado sólido); (3) adesivos de alto desempenho; (4) sensores de deformação vestíveis (*wearable strain sensors*) com impressão 3D; e (5) aplicações terapêuticas, incluindo drug delivery, curativos para feridas e lentes de contato. No campo do drug delivery transdérmico e mucoadesivo, Gupta et al [96] subclassificam os eutectogéis biotecnológicos em três grupos: sistemas de entrega de fármacos (DDS), sistemas de liberação transdérmica (TDDS) e eutectogéis para cicatrização de feridas e engenharia de tecidos, assinalando que a capacidade dos DES de melhorar simultaneamente a solubilidade e a estabilidade de ingredientes farmacêuticos ativos torna os eutectogéis plataformas especialmente adequadas para compostos pouco solúveis e bioativos instáveis. Shaw et al. [91] enfatizam que eutectogéis constituem uma alternativa promissora aos hidrogéis convencionais por serem não voláteis, altamente ajustáveis e capazes de solubilizar agentes terapêuticos insolúveis em água, o que amplia o espectro de ativos que podem ser incorporados a sistemas gel para curativos antimicrobianos. Mercadal et al [89] concluem que a versatilidade e as propriedades ajustáveis dos eutectogéis apresentam potencial imenso para inovação em múltiplas indústrias, com perspectivas de avanços significativos em sustentabilidade ambiental, saúde, armazenamento de energia, biocatálise e embalagens alimentícias, consolidando-os como materiais estratégicos para a próxima geração de sistemas de liberação de compostos bioativos de origem natural.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAL VEGETAL

As flores secas de Hibisco foram obtidas na Feira da Manaus Moderna, Manaus/AM. As amostras foram higienizadas com solução de hipoclorito de sódio 0,2%, lavadas com água, secas e trituradas em um moedor. Todas informações a respeito da amostra foram submetidos ao Sistema Nacional de Patrimônio Genético e

do Conhecimento Tradicional Adquirido (SisGen) e o comprovante se encontra no Material Suplementar.

4.2. PREPARAÇÃO DOS NADES

A preparação dos *NADES* foi realizada de acordo com os seguintes métodos [10, 97] com modificações. Os *NADES* foram preparados em uma única proporção molar por sistema, consistindo em dois componentes, um doador de ligação de hidrogênio (HBD) e um aceitor de ligação de hidrogênio (HBA). Cloreto de Colina (Sigma-Aldrich) (ChCl) e Ácido Lático (Lat) (Synth) foram utilizados como HBA e Xilose (Xyl) (Dinâmica), Glicerol (Gly) (Sigma Aldrich), Ácido Cítrico (Cit) (Dinâmica) e Glicose (Glu) (Dinâmica) foram utilizados como HBD. Os reagentes foram pesados e posteriormente transferidos para béqueres de 150 mL com adição de 20% de água, em relação ao volume de solução. Então, os *NADES* foram submetidos a aquecimento e agitação em banho metabólico a 80 °C até formar um líquido homogêneo transparente. As proporções molares, pesos e porcentagem de água, em mL, são apresentadas na **Tabela 4**. Os sistemas foram armazenados em tubos falcon e mantidos sob refrigeração para análises posteriores.

Tabela 4: Formulações dos *NADES*.

SISTEMA	PROPORÇÃO MOLAR	PESOS (g)	20% DE H ₂ O (mL)
LAT:XYL	1:1	18,016 (LAT) 30,026 (XYL)	6,90
CHCL:GLY	1:2	13,963 (CHCL) 36,836 (GLY)	8,21
LAT:GLY	1:1	18,016 (LAT) 18,418 (GLY)	5,92
LAT:CIT	1:1	18,016 (LAT) 38,442 (CIT)	7,61
CHCL:XYL	1:1	13,963 (CHCL) 30,026 (XYL)	4,28
LAT:GLU	1:1	18,016 (LAT) 36,031 (GLU)	7,60
LAT:GLY:CIT	1:1:1	18,016 (LAT)	10,55

		18,418 (GLY)	
		38,442 (CIT)	

4.3. TRIAGEM DOS NADES

Foi realizada uma triagem com os sete sistemas eutéticos obtidos, de acordo com Jovanović e colaboradores [10] para selecionar o sistema eutético mais adequado para a extração de antocianinas. Para isso, o teor de antocianinas totais foi definido como critério de seleção.

Assim, realizou-se o processo de extração preliminar assistida por ultrassom (UAE), de modo que todos os procedimentos de extração foram executados em um sonificador de ponteira da Vibra Cell VCX 750 (Sonics Materials, Inc., Newtown, CT) a uma potência constante de 320 W, em banho de gelo. Durante a análise de triagem, as condições de extração foram definidas como constantes (tempo de sonicação de 60 minutos, temperatura de 50 °C e proporção de líquido para sólido de 10mL/g). Para reduzir a viscosidade, todos os NADES foram obtidos com 20% v/v de água em sua composição. A eficiência de extração do NADES foi comparada com a do etanol 70% como solvente convencional. A mistura de extração sólido-líquido foi diluída em 2,5mL de água destilada, filtrada com papel de filtro e armazenada em frascos âmbar de 5mL e sob refrigeração para análises posteriores. Todos os experimentos foram realizados em triplicata para obtenção de uma confiabilidade, validade estatística e controle de variabilidade.

4.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH, ABTS, FRAP, FENÓIS TOTAIS E ANTOCIANINAS TOTAIS)

Todos os ensaios antioxidantes foram comparados com a extração por etanol 70% como padrão.

A atividade antioxidante com base no radical DPPH[•], no radical catiônico ABTS^{•+}, no poder antioxidante de redução férrica (FRAP) e nos fenólicos totais foi realizada com base em Mar e colaboradores [98].

4.4.1. DPPH

A capacidade sequestrante de radicais dos sistemas eutéticos foi avaliada utilizando o radical DPPH[•]. Para isso, preparou-se uma solução metanólica de 10 µM

de DPPH• e em seguida, 190 µL foram adicionados à uma solução das amostras na concentração de 1mg/mL. O Trolox, em concentrações de 100 a 2000 µM, foi empregado como controle positivo. A mistura foi mantida no escuro a temperatura ambiente durante 30 min. A absorbância foi medida a 515 nm em Microplate Reader (Biotek, Elx800). O potencial antioxidante foi definido em porcentagem de inibição do radical DPPH com Trolox como controle positivo. O ensaio foi realizado em triplicata. As amostras foram lidas em um leitor de microplacas Epoch 2 Biotek.

4.4.2. FRAP

Para a análise de poder antioxidante de redução férrica (FRAP) foi preparada uma solução de 25 mL de tampão acetato a 300 mmol/L, 2,5mL de 2,4,6-Tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) a 10 mmol/L e 2,5mL de FeCl₃ a 20 mmol/L. Então, foram adicionados 90 µL de cada amostra, em uma placa de 24 poços, 270 µL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP, em triplicata. A leitura foi realizada de imediato em leitor de microplaca (Epoch 2 Biotek) a 595 nm. O reagente FRAP foi usado como branco e sulfato ferroso (FeSO₄) foi usado como controle positivo. A atividade antioxidante total foi determinada pela substituição da equação da linha de absorbância equivalente a 1000 µM de FeSO₄ padrão, e expressos em µM FeSO₄ /g de amostra.

4.4.3. FENÓIS TOTAIS

Para a determinação de compostos fenólicos foi misturado 100µL de amostra com 1 mL de reagente de fenol, 1 mL de bicarbonato de sódio 10% e 4 mL de água destilada. A mistura será feita no escuro por 2 horas. A concentração de compostos fenólicos totais será calculada através da curva de calibração de concentrações conhecidas de ácido gálico na absorbância de 760 nm. Os resultados serão expressos em mg equivalente de ácido gálico por 100mL de amostra.

4.4.4. ANTOCIANINAS TOTAIS

Para o teor total de antocianina dos sistemas baseou-se na abordagem espectrofotométrica de pH único (pH=2), de acordo com Teixeira [99]. O método para pH único consistiu na preparação de uma solução de etanol acidificado, 85mL de Etanol 95% e 15mL HCl 1,5N. A solução foi preparada em um balão de 100mL. Após isso, 1mL da amostra concentrada foi transferida para um béquer de 5mL e foi

adicionado 1mL de etanol acidificado. Após isso, a reação ocorreu no escuro e sob refrigeração por 24h. Então, as amostras foram filtradas em papel filtro para retirada de particulados e corpos de fundo, armazenadas em béqueres de 5mL, foram colhidas alíquotas de 2mL das amostras, transferidas para uma placa de 24 poços e lidas na absorbância de 535 nm, utilizando um leitor de microplacas (Biotek, Epoch 2). O valor adotado para o Coeficiente de Extinção foi de 982 segundo adotado por Teixeira [76]. O teor de antocianinas é calculado através da **Equação 6**:

$$AntT = \frac{DO \times V_{E1} \times V_{E2} \times 1000}{V_{Alq} \times m \times E_{1\%}^{1cm}} \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde, DO é densidade ótica da amostra, V_{E1} e V_{E2} são os volumes da amostra concentrada e diluída, respectivamente, V_{Alq} é o volume da alíquota utilizado na diluição da amostra, m é a massa da amostra, 1000 é o fator de correção para que o resultado seja expresso em 100 gramas de amostra e em mg de antocianina, $E_{1\%}^{1cm}$ é o coeficiente de extinção.

4.5. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL (*DoE = Design of Experiments*)

4.5.1. BOX-BEHNKEN

Visando potencializar a extração de antocianinas, foi realizado um planejamento experimental do tipo Box-Behnken, com três fatores e três níveis, para otimização dos parâmetros do ultrassom. Após a seleção do sistema eutético mais eficiente, esse delineamento permitiu identificar as condições operacionais ideais para maximizar o rendimento da extração assistida por ultrassom.

Os parâmetros escolhidos para compor as variáveis independentes foram potência de sonicação (X_1), temperatura de sonicação (X_2) e tempo de sonicação (X_3). Os valores foram codificados em mínimo (-1), ponto central (0) e máximo (+1). O delineamento de experimentos foi realizado utilizando o software R, versão 4.4.1, utilizando o pacote 'rsm'. A codificação, níveis das variáveis, valores reais e os experimentos codificados estão apresentados nas **Tabela 5 e 6**, respectivamente:

Tabela 5: Codificação e Níveis das Variáveis

FATORES	NÍVEIS
---------	--------

	MÍNIMO (-1)	PONTO CENTRAL (0)	MÁXIMO (+1)
Potência (W)	270	320	370
Temperatura (°C)	20	50	80
Tempo (min)	5	10	15

Tabela 6: Matriz Box-Behnken para três variáveis

EXPERIMENTO	POTÊNCIA	TEMPERATURA	TEMPO
1	+1	+1	0
2	+1	0	-1
3	+1	+1	0
4	0	-1	-1
5(PC)	0	0	0
6	-1	-1	0
7	-1	0	-1
8	-1	0	+1
9	0	+1	-1
10 (PC)	0	0	0
11	0	-1	+1
12 (PC)	0	0	0
13	+1	0	+1
14	-1	+1	0
15	+1	-1	0

(PC) = Ponto Central

4.5.2. METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (*RSM = Response Surface Methodology*)

Após a realização dos experimentos previstos no planejamento Box-Behnken, será utilizada uma superfície de resposta para encontrar os valores que produzirão uma melhor resposta para os parâmetros estudados. Ou seja, os parâmetros de potência, temperatura e tempo de sonicação que produziram a melhor resposta. O

teor de antocianinas totais será analisado como resposta (Y) para o planejamento experimental. Os dados experimentais serão ajustados ao modelo quadrático polinomial na **Equação 7**:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \epsilon \quad (\text{Eq. 7})$$

Onde, Y é a variável dependente (resposta), X_i e X_j são variáveis independentes (fatores), β_0 é o coeficiente constante (intercepto), β_i , β_{ii} e β_{ij} são os coeficientes lineares, quadráticos e de interação entre os fatores X_i e X_j respectivamente, e ϵ é o erro aleatório.

4.6. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA AMOSTRA

4.6.1. Análise por UPLC-QToF-MS/MS

As amostras analíticas foram filtradas em filtro de seringa de PVDF de 0,22 μm diretamente para frascos âmbar de 2 mL e injetadas no sistema UPLC-QToF-MS/MS.

A análise cromatográfica foi conduzida em um sistema ACQUITY UPLC (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) equipado com Sistema de Entrega de Amostra (SDS), amostrador automático com agulha de fluxo contínuo (FTN) e forno de coluna. O sistema foi acoplado a um espectrômetro de massas Xevo G2-XS qToF (Waters Corporation), provido de fonte de ionização por *electrospray* (ESI). O controle do instrumento, a aquisição e o processamento dos dados foram realizados com o software MassLynx™ 4.2 (Waters).

A separação foi obtida em coluna ACQUITY UPLC® BEH C18 (100 $\times$ 2,1 mm; partícula de 1,7 μm), mantida a 40 °C. A fase móvel consistiu no solvente A (água com 0,1% de ácido fórmico) e no solvente B (metanol com 0,1% de ácido fórmico). A eluição seguiu o programa de gradiente: 0–1 min, 5% B; 1–15 min, 20% B; 15–20 min, 40% B; 20–25 min, 80% B; 25–27 min, 95% B; 27,1–30 min, retorno a 5% B para reequilíbrio da coluna. A vazão foi de 0,25 mL·min⁻¹ e o volume de injeção, de 10 μL . As temperaturas da coluna e da bandeja de amostras foram mantidas em 40 °C e 15 °C, respectivamente, assegurando estabilidade e reprodutibilidade.

O espectrômetro qToF operou em modo de ionização por *electrospray* negativo (ESI⁻). Os dados foram adquiridos em modo de resolução de massa aprimorada na faixa de m/z 100–1200. A voltagem do capilar foi ajustada em 2,5 kV; a do cone, em

30 V; a temperatura da fonte, em 120 °C; e a de dessolvatação, em 350 °C. Nitrogênio foi empregado como gás de dessolvatação e de cone, às vazões de 800 e 50 L·h⁻¹, respectivamente. Leucina-encefalina (*m/z* 554,2615 em modo negativo) foi infundida como massa de referência (*lock mass*) para calibração de massa em tempo real, garantindo exatidão dentro de ±2 ppm.

Todas as análises foram realizadas em modo *full scan* TOF e processadas no MassLynx™ para obtenção de medidas de massa exata, padrões isotópicos e espectros de fragmentação. A identificação tentativa dos metabólitos baseou-se na massa exata, na composição elementar e nos padrões de fragmentação MS/MS, em comparação com padrões autênticos ou dados de literatura.

4.6.2. ANÁLISE POR HPLC-DAD

As amostras analisadas por UPLC-QToF-MS/MS foram igualmente injetadas em HPLC-DAD. As análises cromatográficas foram realizadas em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (série Prominence, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), equipado com bomba quaternária (LC-20AD), desgaseificador on-line (DGU-20A5), amostrador automático (SIL-20A HT), forno de coluna (CTO-20A), detector de arranjo de diodos (SPD-M20A) e controlador de sistema (CBM-20A). O controle, a aquisição e o processamento dos dados foram conduzidos no software LabSolutions (Shimadzu).

A separação dos analitos foi obtida em coluna CORTECS T3 (4,6 × 100 mm; partícula de 2,7 µm; Waters Corporation, Milford, MA, EUA), mantida a 35 °C. A fase móvel consistiu no solvente A (ácido fórmico 0,1% em água) e no solvente B (metanol com 0,1% de ácido fórmico). A eluição empregou gradiente linear otimizado para o perfil de compostos fenólicos: 0–2 min, isocrático a 5% B; 2–5 min, 5–10% B; 5–15 min, 10–60% B; 15–20 min, 60–80% B; 20–22 min, 80–100% B; 22–25 min, 100–5% B, seguido de reequilíbrio de 2 min nas condições iniciais. A vazão foi de 1,0 mL·min⁻¹ e o volume de injeção, de 25 µL.

A detecção foi realizada com detector de arranjo de diodos (DAD), em varredura de 200 a 600 nm. Os cromatogramas foram monitorados a 520 nm, e os espectros UV–Vis foram utilizados para confirmar a identidade dos compostos.

4.6.3. ESPECTROMETRIA FTIR

Para determinar o perfil químico do NADES e do extrato NADES de hibisco, foi utilizado o espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier com módulo de reflexão total atenuada (FTIR-ATR) da Agilent Cary (630 FTIR-ATR), usando um cristal ZnSe ATR. A análise da amostra de NADES puro e do extrato foi realizada na faixa de 680 a 4000 cm^{-1} . Os perfis de espectro de FTIR das amostras foram tratados e gerados no Origin 7

4.7. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO HIDROGEL DE HPMC

Após a caracterização da substância ativa (extrato de hibisco), lotes de bancada foram desenvolvidos de acordo com um planejamento quali-quantitativo, seguindo o recomendado pelo Handbook of Pharmaceutical Excipients [100] e o Formulário Médico-Farmacêutico [101]. O hidrogel de HPMC à base extrato de hibisco foi desenvolvido fundamentado nos resultados obtidos através dos estudos de pré-formulação e as boas práticas de fabricação (RDC No 301/2019 da ANVISA).

Com o intuito de desenvolver a melhor formulação para a incorporação da substância ativa, foram desenvolvidas 4 formulações de bancada, denominadas Gel Padrão 1 (GP1), Gel Padrão 2 (GP2), Gel Teste 1 (GT1) e Gel Teste 2 (GT2), variando excipientes conforme a **Tabela 6**.

Tabela 6: Formulações desenvolvidas dos hidrogéis de HPMC

Matéria prima	Lotes			
	GP1	GP2	GT1	GT2
HPMC	3% (1,5g)	3% (1,5g)	3% (1,5g)	3% (1,5g)
Propilenoglicol	5% (2,5g)	5% (2,5g)	-	-
NADES	-	-	8% (4g)	
Extrato de Hibisco	-	3% (1,5g)		8% (4g)
Água	90% (46g)	89% (44,5g)	89% (44,5g)	89% (44,5g)
Total (%)	100% (50g)	100% (50g)	100% (50g)	100% (50g)

Em um Becker foi aquecida a água purificada a uma temperatura entre 70°C e 80°C. Em seguida, foi o HPMC lentamente à água quente sob agitação vigorosa com auxílio de agitador mecânico. Remova a mistura do aquecimento mantendo agitação até a temperatura de 40°C. Misturou-se a NADES e/ou propilenoglicol e o extrato de hibisco. Deixar o gel em repouso por 24 horas em geladeira (4°C a 8°C), para as bolhas de ar sair.

4.7.1. CARACTERIZAÇÃO DO HIDROGEL DE HPMC

No controle de qualidade da forma farmacêutica semissólida foram realizadas as análises de determinação do pH, densidade relativa e densidade absoluta e espalhabilidade.

4.7.2. pH

A determinação do pH foi feita utilizando um potenciômetro calibrado (pHmetro Digital, DEL LAB), que foi ajustado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0. As análises foram realizadas a partir da imersão do eletrodo diretamente nas amostras à 25 °C. A leitura obtida por meio desse processo permitiu a determinação do pH de cada amostra.

4.7.3. DENSIDADE

A densidade de massa (ρ) de uma substância é a razão entre sua massa e seu volume a 20 °C. A densidade de massa (ρ_t) foi determinada em uma temperatura de 20 °C e calculada a partir da fórmula:

$$\rho_t = \frac{m}{V}, \text{ sendo } m = X_c - X_v \text{ (Eq. 8)}$$

Onde:

D= densidade de massa;

t = temperatura;

m = massa da amostra

Xc = peso do picnômetro com as amostras

Xv = peso do picnômetro vazio

V = volume do picnômetro

A densidade relativa é definida como a razão entre a massa de uma substância ao ar a 20 °C e a massa de um volume igual de água na mesma temperatura. A densidade relativa foi realizada através de um picnômetro de inox (Brasil, 2019), foi necessário utilizar um picnômetro limpo e seco, com capacidade de 25 mL, que foi previamente calibrado. A calibração consistiu na determinação da massa do picnômetro vazio e da massa do seu conteúdo com água, recentemente destilada, a uma temperatura de 20°C. A amostra foi transferida para o picnômetro e a temperatura foi ajustada para 20°C. Em casos de excesso de substância, o excesso foi removido antes da pesagem. O peso da amostra foi obtido pela diferença de massa entre o picnômetro cheio e vazio. Foi realizado o cálculo da densidade relativa por meio da fórmula:

$$d = \frac{P_2 - P_0}{P_1 - P_0} \text{ (Eq. 9)}$$

Onde:

d = densidade relativa;

P₀ = peso do picnômetro vazio;

P₁ = peso do picnômetro com água purificada;

P₂ = peso do picnômetro com as amostras.

4.7.4. TESTE DE ESPALHABILIDADE

A espalhabilidade das formulações foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Knorst [102]. Utilizou-se uma placa molde de acrílico circulares de 20 cm de diâmetro, 0,3 cm de espessura e com orifício central com diâmetro de 1,2 cm, sobreposta sobre uma placa de vidro quadrada (20 cm x 20 cm), ambas colocadas sobre uma folha de papel milimetrado. Adicionou-se aproximadamente 1 g de amostra no orifício, nivelando com auxílio de uma espátula. Retirou-se a placa circular e sobre a amostra foram colocadas cinco placas de acrílico de massa definidos, sucessivamente em intervalos de um minuto, com anotação dos diâmetros formados nas posições vertical e horizontal. As placas tinham os respectivos pesos: placa 1- 92,8850 g; placa 2- 95,95 g; placa 3 -96,00 g; placa 4- 120,1239 g e placa 5- 123,03 g. Para o cálculo da espalhabilidade foi utilizada a seguinte equação [103]:

$$E_i = \frac{d^2\pi}{4} \text{ (Eq. 10)}$$

Onde

E_i = espalhabilidade da amostra para o peso i (mm^2)

d = diâmetro

4.7.5. HET-CAM

Para a realização deste ensaio, foram utilizados três ovos embrionados com oito dias de incubação. A casca do ovo foi retirada ao redor da câmara de ar evidenciando a membrana interna. Esta foi removida cuidadosamente para exposição da membrana cório-alantoide (CAM). Foram administrados 300 μL de cada amostra sobre a CAM e esta foi observada e fotodocumentada nos tempos 0, 30, 120 e 300 segundos, a fim de identificar as reações fisiológicas decorrentes da exposição as amostras, com extrato de hibisco (EHBC) nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/mL , além da formulação em gel com hibisco (FHBC), Gel sem o extrato (GSEX) e solvente livre (SVTL). Como controle positivo utilizou-se o hidróxido de sódio a 0,1 mol/L e como controle negativo, soro fisiológico a 0,9%. Por fim, as alterações foram fotodocumentadas ao longo de 5 minutos, observando os três pontos finais: hemorragia (sangramento dos vasos), lise vascular (desintegração de vasos sanguíneos) e a coagulação (desnaturação proteica intra e extravascular). A avaliação segue uma faixa média de classificação em score, 0,0 – 0,9 (não irritante); 1,0 – 4,9 (irritante leve); 5,0 – 8,9 (irritante moderado); 9,0 – 21 (irritante severo) [104].

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar o teor de antocianinas extraídas, os dados obtidos serão submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, se os dados apresentarem normalidade ($p > 0,05$), serão submetidos à análise de variância (ANOVA) de um fator, seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$), visando identificar o sistema eutético com melhor desempenho na extração.

A comparação entre os diferentes ensaios antioxidantes foi realizada para cada ensaio antioxidante, a normalidade da distribuição de cada amostra foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando todas as amostras de um mesmo ensaio apresentaram distribuição normal ($p > 0,05$), seguiu-se com ANOVA de um fator e, em caso de

significância, com o teste post-hoc de Tukey HSD. Quando ao menos uma amostra apresentou desvio de normalidade ($p \leq 0,05$), aplicou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido, em caso de significância, do teste post-hoc de Dunn com ajuste de Bonferroni para comparações múltiplas.

Para os ensaios analisados por ANOVA, o pressuposto de homogeneidade de variâncias foi verificado pelo teste de Levene (com base na mediana). O nível de significância adotado foi $\alpha = 0,05$ em todos os testes. As análises foram conduzidas em Python (SciPy 1.17.1; scikit-posthocs 0.13.0). Os dados consistem em triplicatas ($n = 3$) por amostra.

Após a avaliação do melhor sistema, este foi submetido ao planejamento Box-Behnken e os dados gerados foram ajustados a um modelo de regressão quadrático e analisados por ANOVA, a fim de avaliar a significância dos efeitos principais, das interações e dos termos quadráticos. A qualidade do modelo foi verificada por meio dos coeficientes de determinação (R^2 e R^2 ajustado), e a condição ótima de extração foi identificada por análise de superfícies de resposta (RSM).

Ao final do planejamento experimental para otimização da extração, foi realizado um experimento de estabilidade de antocianinas. A estabilidade das antocianinas no extrato etanólico e no NADES será avaliada ao longo do tempo sob a bancada, exposto à luz, a temperatura ambiente. O teor de compostos será monitorado em intervalos regulares e os dados de degradação serão submetidos à ANOVA de medidas repetidas. Os dados deste teste foram avaliados no *software* R (versão 4.4.1).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. OBTENÇÃO DOS NADES

Os NADES foram obtidos de acordo com os parâmetros apresentados na **Tabela 1**. Após o processo de agitação e aquecimento, as misturas dos componentes dos NADES tornaram-se em líquidos homogêneos transparentes, por causa do fenômeno de abaixamento da temperatura de fusão no ponto eutético. Devido à diferença de densidade e massa molar entre os componentes de cada NADES, os volumes obtidos foram diferentes, conforme apresentado no **Tabela 7**.

Tabela 7: Volume dos NADES obtidos

NADES	VOLUME (mL)
LAT:XYL (1)	41,42
ChCL:GLY (2)	49,27
LAT:GLY (3)	35,55
LAT:CIT (4)	45,66
CHCL:XYL (5)	25,68
LAT:GLU (6)	45,58
LAT:GLY:CIT (7)	52,78

Durante a etapa de aquecimento, os NADES apresentaram o aspecto de gel viscoso, de coloração branca e translúcido. Conforme o tempo em aquecimento avançou, esse aspecto mudou gradualmente para um líquido viscoso transparente. Essas observações estão de acordo com o estudo realizado por Koh e colaboradores [97]. Eles apontam que a etapa de aquecimento é crucial para a formação dos NADES, pois facilita a dissolução dos sólidos ao reduzir as forças coesivas e promover o aumento da entropia, o que ocasiona maiores colisões entre as moléculas de HBA e HBD facilitando a formação de ligações de hidrogênio e reduzindo o ponto de fusão.

Após 7 dias, apenas os sistemas 1 e 5 apresentaram uma gradual recristalização, portanto, não sendo estáveis. Todos os outros mantiveram-se estáveis, como líquidos homogêneos transparentes. Isso se deve ao fato de que NADES à base de xilose são propensos à cristalização e à degradação devido às características exclusivas da xilose, uma pentose menos estável que a glucose [83].

5.2. TRIAGEM DOS NADES

5.2.1. TEOR DE ANTOCIANINAS TOTAIS

Após sonicação e filtragem, foi quantificado o teor de antocianinas totais, pelo método de pH único, presentes nos eutéticos com hibisco. Os valores do teor de antocianinas estão apresentados na **Tabela 7**:

Tabela 7: Teor de antocianinas das extrações por NADES

Amostra	Antocianinas totais (mg/mL)
LAT:XYL (1)	3,710±0,03
ChCl:GLY (2)	7,57±0,02
LAT:GLY (3)	8,31±0,02
LAT:CIT (4)	7,73±0,02
ChCl:XYL (5)	5,01±0,01
LAT:GLU (6)	5,67±0,02
LAT:GLY:CIT (7)	10,63±0,02
Etanol 70% (8)	5,88±0,03

Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=3). Os dados foram avaliados por ANOVA de um fator, seguido de teste de Tukey.

Entre os NADES avaliados, os formados por ácidos orgânicos e polióis (amostras 2, 3, 4 e 7) demonstraram os maiores teores de antocianinas em relação a amostra 8, indicando que o caráter ácido favorece a extração desses compostos. Os resultados em ordem decrescente são: LAT:GLY:CIT (7) > LAT:GLY (3) > LAT:CIT (4), CHCL:GLY (2) > ETANOL 70% (8) > LAT:GLU (6) > CHCL:XYL (5) > LAT:XYL (1). Essa observação está em concordância com a literatura, que relata, em estudos de extração de antocianinas por NADES em diferentes matrizes vegetais, que a seleção de um NADES apropriado para essa finalidade geralmente inclui um componente de ácido orgânico, como ácido cítrico, ácido lático ou ácido oxálico [10, 44-59,105-107].

Os resultados obtidos eram esperados, em relação ao etanol 70%, uma vez que NADES contendo ácidos carboxílicos apresentam alta polaridade (superior à dos NADES à base de açúcares e polióis), favorecendo a extração de compostos fenólicos polares, como as antocianinas. Em meio ácido, as antocianinas tornam-se mais estáveis devido à formação de cátions flavílio, o que aumenta ainda mais sua polaridade. Além disso, a presença de grupos hidroxila (GLY, CIT) facilita a formação de ligações de hidrogênio com os compostos alvo, aumentando a eficiência da extração. [46,52].

A combinação LAT:GLY:CIT resultou no maior teor de antocianinas (10,630 mg/mL), o que pode sugerir um possível efeito sinérgico entre os componentes. Enquanto o ácido cítrico contribui para a acidez e polaridade, o glicerol atua como um modificador de viscosidade, melhorando a difusividade do solvente. O ácido láctico, por sua vez, por possuir apenas um grupo carboxila, minimiza o impedimento estérico, permitindo maior interação com as antocianinas [108].

As amostras 2, 3 e 4 também apresentaram teores satisfatórios. Devido à natureza ácida e alta polaridade desses sistemas, a solubilização de compostos fenólicos polares, como as antocianinas, é favorecida [56, 109]

As amostras 1, 5 e 6 apresentaram teores inferiores, possivelmente devido à menor acidez e à maior viscosidade, que podem limitar a difusão do solvente na matriz vegetal. A xilose, apesar de ser um açúcar, tem menor capacidade de formar ligações de hidrogênio eficientes em comparação a glucose, justificando a diferença entre as amostras 5 e 6. Além disso, apesar dos NADES à base de ácido cítrico apresentarem maior polaridade em comparação aos de ácido láctico, a presença de três grupos carboxila e múltiplos grupos hidroxila no ácido cítrico reduz a eficiência da extração devido a efeitos estéricos. Por outro lado, o ácido láctico permite uma interação mais eficiente, por possuir apenas uma carboxila, resultando em maior extração de compostos bioativos [48, 56, 108].

Além disso, adicionar água na composição do eutético e a utilização do ultrassom contribuíram para o processo de extração, aumentando sua polaridade, diminuindo a viscosidade dos sistemas, acarretando numa melhor transferência de massa (devido à cavitação pelo ultrassom e adição de água), possibilitando uma melhor solubilização das antocianinas [110].

Como resultado, o sistema 7 (LAT:GLY:CIT) foi utilizado para a otimização dos parâmetros de ultrassom.

5.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Após a realização dos ensaios de DPPH, FRAP, fenóis totais e antocianinas totais, os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão (**Tabela 8**), considerando três repetições por amostra. Os diferentes sistemas extratores avaliados

influenciaram de maneira distinta a extração de compostos bioativos do hibisco, refletindo-se tanto na capacidade antioxidante quanto nos teores de antocianinas e fenóis totais.

Tabela 8: Atividade antioxidante, antocianinas totais e fenóis totais dos extratos de hibisco obtidos com diferentes sistemas extratores.

Amostra	DPPH ($\mu\text{M TE/mL}$)	FRAP ($\mu\text{M Fe(II)/mL}$)	Fenóis totais
LAT:XYL (1)	1254,250 $\pm$ 137,568	629,292 $\pm$ 8,036	535,517 $\pm$ 1,379
ChCl:GLY (2)	1330,083 $\pm$ 191,072	1495,958 $\pm$ 21,262	ND
LAT:GLY (3)	1518,417 $\pm$ 21,554	1466,375 $\pm$ 16,250	98,621 $\pm$ 1,034
LAT:CIT (4)	1492,583 $\pm$ 16,266	668,875 $\pm$ 14,197	17,931 $\pm$ 1,034
ChCl:XYL (5)	1528,417 $\pm$ 11,547	1464,708 $\pm$ 41,105	ND
LAT:GLU (6)	1485,083 $\pm$ 68,298	1435,958 $\pm$ 30,678	194,483 $\pm$ 1,029
LAT:GLY:CIT (7)	1553,417 $\pm$ 7,638	824,708 $\pm$ 82,824	127,241 $\pm$ 1,038
Etanol 70% (8)	367,680 $\pm$ 31,470	430,870 $\pm$ 14,870	131,161 $\pm$ 10,25

Resultados expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n = 3). Para FRAP e antocianinas totais, letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *Comparação significativa entre LAT:GLY:CIT (7) e etanol 70% pelo teste de Dunn-Bonferroni no DPPH ($p = 0,0131$). †Comparação significativa entre LAT:XYL (1) e LAT:CIT (4) pelo teste de Dunn-Bonferroni para fenóis totais ($p = 0,0087$). ND = dado não determinado/não apresentado na planilha estatística analisada.

As amostras LAT:GLY (3) e LAT:GLY:CIT (7) apresentaram os maiores teores de antocianinas totais entre os sistemas avaliados, com destaque para LAT:GLY:CIT (7), que atingiu $10,63 \pm 0,02$ mg/mL. Esse mesmo sistema também apresentou a maior média no ensaio DPPH, com $1553,42 \pm 7,64$ $\mu\text{M TE/mL}$. Esses resultados sugerem que a associação entre ácido láctico, glicerol e ácido cítrico favoreceu a extração de compostos relacionados à atividade sequestradora de radicais livres, especialmente antocianinas.

No ensaio FRAP, entretanto, o maior desempenho não foi observado para LAT:GLY:CIT (7), mas para ChCl:GLY (2), LAT:GLY (3), ChCl:XYL (5) e LAT:GLU (6), que formaram o grupo estatístico de maior poder redutor férrico. Esse comportamento indica que a resposta antioxidante medida pelo FRAP não depende exclusivamente do teor de antocianinas, podendo estar relacionada à extração de outros compostos

redutores, como ácidos fenólicos e demais constituintes fenólicos presentes na matriz vegetal.

A comparação com o etanol 70% evidencia o potencial dos NADES como sistemas alternativos de extração. O etanol 70% apresentou a menor média no DPPH e no FRAP, enquanto alguns sistemas NADES apresentaram desempenho superior nesses ensaios. Ainda assim, a interpretação estatística deve considerar o tipo de teste aplicado em cada variável, o número reduzido de repetições e o efeito das correções para múltiplas comparações.

5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ANTIOXIDANTES

Para verificar o efeito da composição dos solventes sobre os resultados obtidos, os dados foram inicialmente avaliados quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Quando os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias foram atendidos, aplicou-se ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey HSD. Nos casos em que a normalidade não foi observada, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn com correção de Bonferroni. O resumo dos testes aplicados para cada ensaio, bem como os respectivos valores de significância, está apresentado na **Tabela 9**.

Tabela 9: Síntese dos testes estatísticos aplicados aos ensaios antioxidantes e aos teores de compostos bioativos.

Ensaio	Perfil dos dados	Teste principal	Resultado global	Pós-teste	Resumo
DPPH	Não paramétrico	Kruskal-Wallis	H = 18,09; p = 0,0116	Dunn-Bonferroni	Significativo apenas para Etanol 70% vs LAT:GLY:CIT.
FRAP	Paramétrico	ANOVA de um fator	F = 470,50; p < 0,001	Tukey HSD	Grupo superior: ChCl:GLY, LAT:GLY, ChCl:XYL e LAT:GLU.
Antocianinas totais	Paramétrico	ANOVA de um fator	F = 13.881,24; p < 0,001	Tukey HSD	Todos os pares diferiram; LAT:GLY:CIT foi superior.

Ensaio	Perfil dos dados	Teste principal	Resultado global	Pós-teste	Resumo
Fenóis totais	Não paramétrico	Kruskal-Wallis	$H = 13,87$; $p = 0,0165$	Dunn-Bonferroni	Significativo apenas para LAT:CIT vs LAT:XYL.

O detalhamento das estatísticas descritivas, testes de pressupostos e comparações múltiplas é apresentado na seção de Material suplementar.

5.4.1. DPPH

Para o DPPH, o teste de Shapiro-Wilk indicou ausência de normalidade para a amostra ChCl:XYL (5). Considerando esse resultado, a comparação global entre os sistemas foi realizada por Kruskal-Wallis, que indicou diferença significativa entre as amostras ($H = 18,09$; $p = 0,0116$). No pós-teste de Dunn com correção de Bonferroni, apenas a comparação entre etanol 70% e LAT:GLY:CIT (7) permaneceu estatisticamente significativa. Portanto, embora diversos sistemas NADES tenham apresentado médias numericamente superiores ao etanol 70%, a superioridade estatística mais robusta foi confirmada para LAT:GLY:CIT (7).

5.4.2. FRAP

No ensaio FRAP, todas as amostras apresentaram distribuição compatível com a normalidade e as variâncias foram homogêneas. A ANOVA de um fator indicou diferença altamente significativa entre os sistemas extratores ($F = 470,50$; $p < 0,001$). O teste de Tukey agrupou ChCl:GLY (2), LAT:GLY (3), ChCl:XYL (5) e LAT:GLU (6) no mesmo grupo estatístico, caracterizando-os como os sistemas com maior poder redutor férrico. LAT:GLY:CIT (7) apresentou desempenho intermediário, enquanto o etanol 70% formou o grupo de menor resposta no FRAP.

5.4.3. ANTOCIANINAS TOTAIS

Para antocianinas totais, os pressupostos paramétricos foram atendidos e a ANOVA demonstrou efeito altamente significativo do sistema extrator ($F = 13.881,24$; $p < 0,001$). O teste de Tukey indicou diferença significativa entre todos os pares avaliados. LAT:GLY:CIT (7) apresentou o maior teor de antocianinas totais, seguido por LAT:GLY (3), LAT:CIT (4) e ChCl:GLY (2). Com base nos resultados

apresentados, o sistema LAT:GLY:CIT (7) foi selecionado para a etapa de otimização, a qual tem por objetivo principal maximizar a extração de antocianinas.

5.4.4. FENÓIS TOTAIS

Para fenóis totais, a normalidade não foi observada para LAT:XYL (1) e LAT:GLY (3), justificando o uso do teste de Kruskal-Wallis. O teste indicou diferença global significativa entre as amostras avaliadas ($H = 13,87$; $p = 0,0165$). Entretanto, após a correção de Bonferroni, apenas a comparação entre LAT:CIT (4) e LAT:XYL (1) permaneceu significativa. Assim, as diferenças numéricas observadas entre as médias de fenóis totais devem ser interpretadas com cautela, especialmente devido ao número reduzido de repetições e ao efeito conservador da correção para múltiplas comparações.

Em conjunto, os resultados indicam que os NADES apresentaram desempenho superior ou comparável ao etanol 70% na extração de compostos antioxidantes do hibisco. O sistema LAT:GLY:CIT (7) destacou-se principalmente pela maior extração de antocianinas totais e pela elevada resposta no ensaio DPPH, justificando sua escolha como sistema promissor para a etapa de otimização. Por outro lado, os resultados de FRAP demonstram que diferentes composições de solvente podem favorecer mecanismos antioxidantes distintos, reforçando a necessidade de interpretar os ensaios de atividade antioxidante de forma conjunta e não como medidas equivalentes de um único fenômeno químico.

5.5. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO POR PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN E METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Após a seleção do sistema LAT:GLY:CIT como NADES mais eficiente para a extração de antocianinas dos cálices de *Hibiscus sabdariffa* L., os parâmetros operacionais da extração assistida por ultrassom foram otimizados por meio de um planejamento Box-Behnken (BBD) de três fatores e três níveis, conforme descrito na seção 4.5. As variáveis independentes consideradas foram potência de sonicação (X1), temperatura (X2) e tempo de sonicação (X3), e o teor de antocianinas totais (Y, em mg de antocianinas/mL) foi adotado como variável-resposta. Os experimentos

foram conduzidos em ordem aleatória e os três pontos centrais foram utilizados para estimar o erro experimental puro.

5.5.1. Ajuste do Modelo Polinomial Quadrático

Os dados experimentais foram ajustados ao modelo polinomial de segunda ordem (Eq. 7) e os coeficientes obtidos foram utilizados para construir o modelo em variáveis reais, apresentado na Equação 8:

$$y = -2,989 + 0,0341X_1 - 0,0217X_2 + 0,9304X_3 - 2,28 \times 10^{-5}X_1^2 - 2,74 \times 10^{-5}X_2^2 - 8,71 \times 10^{-4}X_3^2 + 1,02 \times 10^{-4}X_1X_2 - 2,70 \times 10^{-3}X_1X_3 - 1,68 \times 10^{-3}X_2X_3 \text{ (Eq. 11)}$$

O modelo apresentou coeficiente de determinação $R^2 = 0,917$ e R^2 ajustado = 0,811, indicando que aproximadamente 91,7% da variabilidade observada no teor de antocianinas é explicada pelo modelo. A diferença de 0,106 entre R^2 e R^2 ajustado sugere a presença de termos não significativos no modelo, o que é confirmado pela análise de variância apresentada a seguir.

5.5.2. Análise de Variância (ANOVA)

A significância estatística dos termos do modelo foi avaliada por meio da análise de variância (ANOVA), com nível de significância $\alpha = 0,05$. Os resultados estão apresentados na **Tabela 10**.

Tabela 10: Análise de variância (ANOVA) do modelo polinomial de segunda ordem para o teor de antocianinas extraídas.

Termo	Soma de Quadrados	gl	F	p-valor	Sig.
X_1 (Potência)	0,0716	1	1,80	0,2216	ns
X_2 (Temperatura)	0,0304	1	0,76	0,4110	ns
X_3 (Tempo)	1,4565	1	36,65	0,0005	***
X_1^2	0,0137	1	0,34	0,5755	ns
X_2^2	0,0026	1	0,06	0,8071	ns
X_3^2	0,0020	1	0,05	0,8290	ns
X_1X_2	0,0928	1	2,33	0,1704	ns

X_1X_3	1,8202	1	45,80	0,0003	***
X_2X_3	0,2534	1	6,38	0,0395	*
Resíduo	0,2782	7	—	—	—

*ns = não significativo; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; gl = graus de liberdade.*

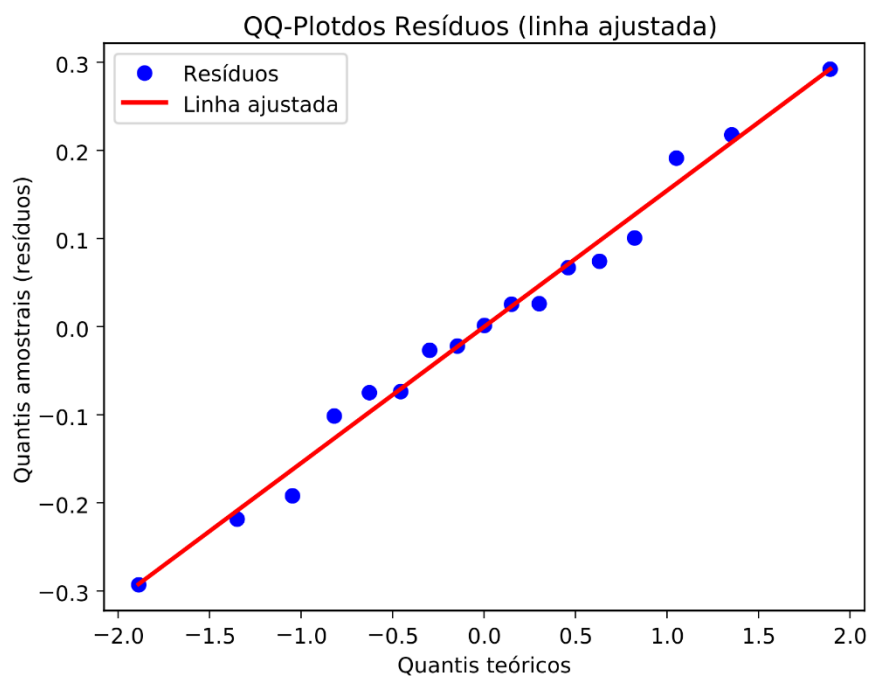
A ANOVA revelou que apenas três termos foram estatisticamente significativos: o efeito principal do tempo de sonicação (X_3 ; $p = 0,0005$), a interação potência $\times$ tempo (X_1X_3 ; $p = 0,0003$) e a interação temperatura $\times$ tempo (X_2X_3 ; $p = 0,0395$). Notavelmente, nenhum dos termos quadráticos puros apresentou significância, indicando ausência de curvatura detectável na superfície de resposta dentro da janela experimental investigada [63, 64].

Adicionalmente, observa-se que os efeitos principais X_1 (potência) e X_2 (temperatura) não foram individualmente significativos, embora ambos participem de interações significativas com X_3 . Esse padrão é compatível com sistemas em que a magnitude do efeito de uma variável é fortemente dependente do nível de outra, configurando um caso clássico de dominância de interações sobre efeitos principais [66].

5.5.3. Diagnóstico do Modelo

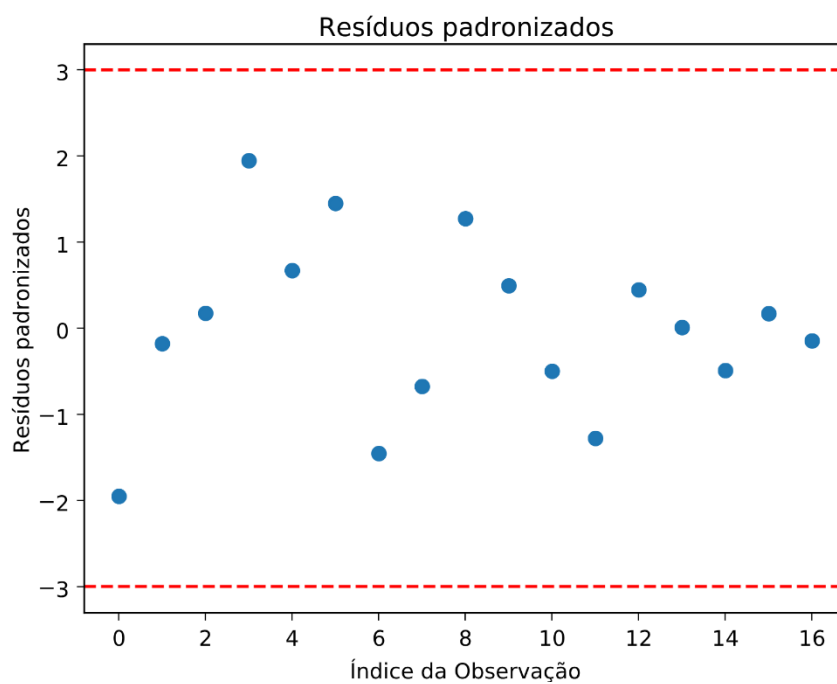
A adequação do modelo foi verificada por meio da análise dos resíduos (Figuras 10, 11 e 12). O gráfico Q-Q dos resíduos (Figura 10) demonstra alinhamento satisfatório dos pontos com a reta de referência, indicando distribuição aproximadamente normal dos erros.

Figura 10:Gráfico Q-Q dos resíduos



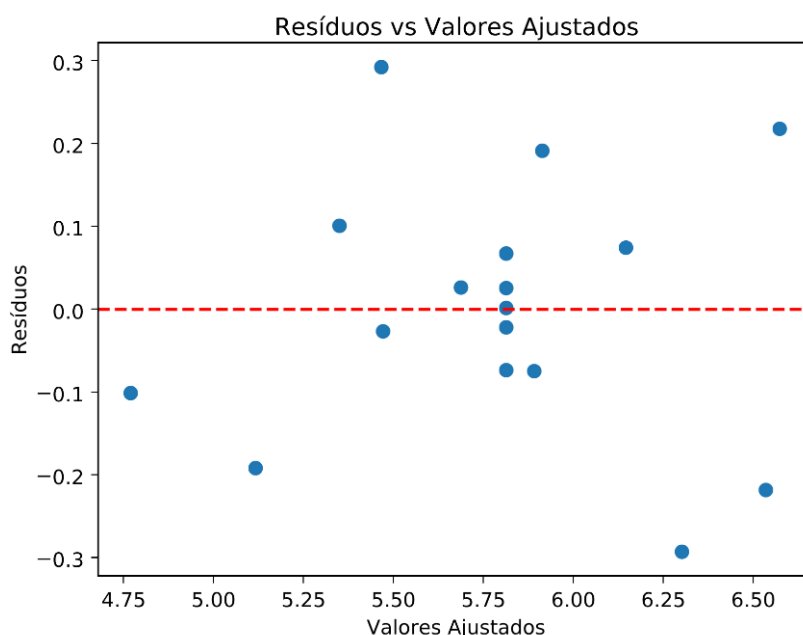
Fonte: O Autor (2026)

Figura 11: Resíduos padronizados



Fonte: O Autor (2026)

Figura 12: Resíduos vs Valores ajustados



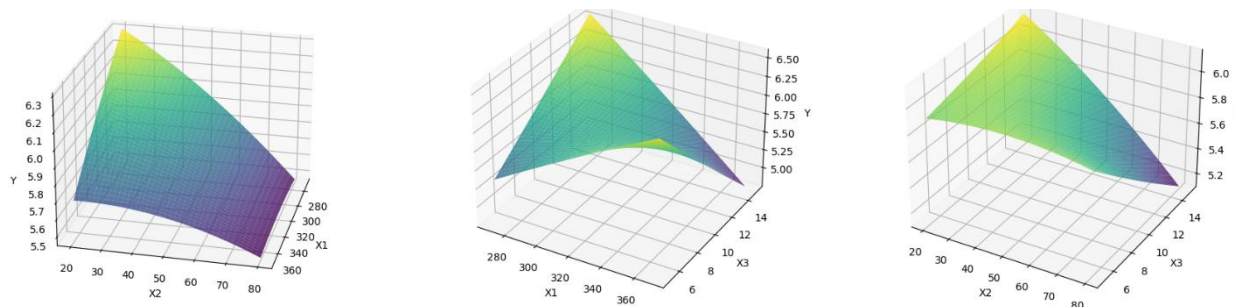
Fonte: O Autor (2026)

Os resíduos padronizados (**Figura 11**) situaram-se entre -2 e $+2$, sem indícios de observações atípicas (limites convencionais de ± 3). O gráfico de resíduos versus valores ajustados (**Figura 12**) não evidenciou padrões sistemáticos, curvatura residual ou heterocedasticidade, sustentando as premissas do modelo de regressão linear. A baixa dispersão entre as cinco repetições do ponto central (320 W, 50 °C, 10 min), com resposta variando entre 5,74 e 5,88 mg/mL, confirma adequada repetibilidade experimental.

5.5.4. Análise das Interações e da Topologia da Superfície de Resposta

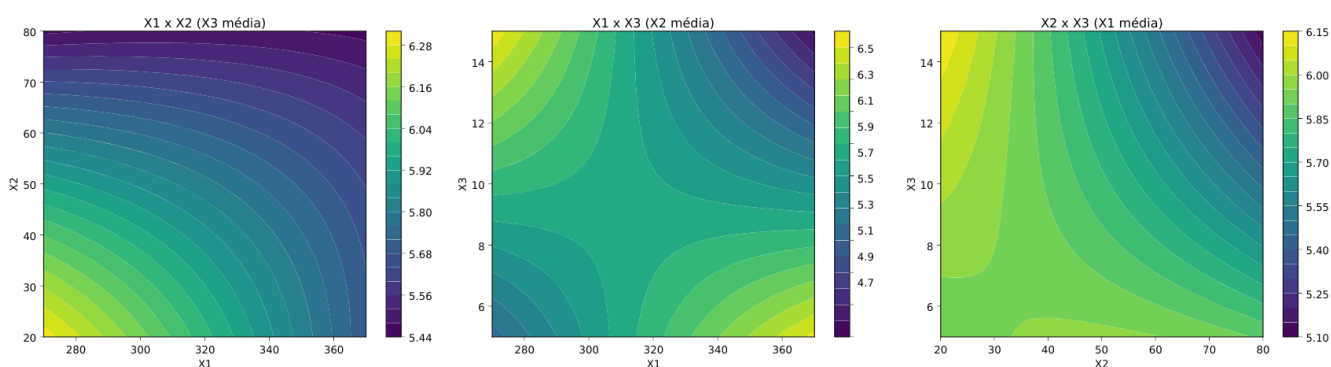
As superfícies de resposta tridimensionais e os respectivos gráficos de contorno bidimensionais para as combinações $X1 \times X2$, $X1 \times X3$ e $X2 \times X3$ estão apresentados nas **Figuras 13 e 14**. A análise gráfica corrobora o que a ANOVA já indicara: a superfície apresenta inclinação acentuada em direção a combinações específicas dos fatores e ausência de máximo interno bem definido, consequência direta da não significância dos termos quadráticos.

Figura 13: Superfícies de resposta tridimensionais do planejamento fatorial



Fonte: O Autor (2026)

Figura 14: Gráficos de contornos bidimensionais das interações entre os parâmetros do planejamento fatorial



Fonte: O Autor (2026)

A interação X_1X_3 (potência $\times$ tempo) constitui o achado mais relevante do planejamento. O sinal negativo do coeficiente ($\beta_{13} = -2,70 \times 10^{-3}$) indica antagonismo: em baixa potência (270 W), o aumento do tempo de sonicação de 5 para 15 min elevou o teor de antocianinas de 5,45 para 6,50 mg/mL; em contrapartida, em alta potência (370 W), o mesmo aumento de tempo provocou redução da resposta, de 6,32 para 4,67 mg/mL. Esse comportamento é coerente com a literatura, que reporta a degradação de antocianinas em condições prolongadas de cavitação ultrassônica em alta potência, em razão da geração de radicais hidroxila e do estresse térmico local nas microbolhas, capazes de oxidar o cátion flavílio e abrir o anel heterocíclico [48, 110].

A interação X_2X_3 (temperatura $\times$ tempo), com coeficiente também negativo ($\beta_{23} = -1,68 \times 10^{-3}$) e significância marginal ($p = 0,0395$), segue lógica análoga: tempos longos em temperaturas elevadas favorecem a degradação térmica das antocianinas, conhecidamente termolábeis [29].

5.5.5. Predição e Validação Experimental dos Pontos Ótimos

A otimização numérica do modelo identificou dois pontos de resposta máxima localizados em vértices opostos do domínio experimental: a condição denominada *ótimo global* ($X_1 = 270$ W, $X_2 = 20$ °C, $X_3 = 15$ min), com resposta predita $Y = 7,00$ mg/mL, e a condição denominada *ótimo local* ($X_1 = 370$ W, $X_2 = 80$ °C, $X_3 = 5$ min), com Y predito = 6,58 mg/mL. A localização de ambos os pontos nos vértices do hipercubo experimental, associada à ausência de curvatura significativa, sugeriu que o verdadeiro ótimo poderia situar-se nas proximidades destes vértices ou levemente além deles.

Para verificar a capacidade preditiva do modelo nessas regiões, foram realizados ensaios confirmatórios em triplicata nas duas condições. Os resultados estão apresentados na **Tabela 11**.

Tabela 11: Validação experimental das condições ótimas previstas pelo modelo polinomial de segunda ordem.

Condição	X_1 (W)	X_2 (°C)	X_3 (min)	Y predito (mg/mL)	Y observado (mg/mL)	Erro relativo (%)
Ótimo global	270	20	15	7,00	6,52	-6,9
Ótimo local	370	80	5	6,58	≈ 5,70	-13,4

$$\text{Erro relativo} = (Y \text{ observado} - Y \text{ predito}) / Y \text{ predito} \times 100.$$

A análise dos pontos confirmatórios revelou duas observações fundamentais. Em primeiro lugar, a condição de ótimo global foi corroborada experimentalmente: o teor observado (6,52 mg/mL) representa o maior valor obtido em todo o conjunto experimental e supera em aproximadamente 12% a melhor resposta do planejamento original (6,50 mg/mL, na condição 270/50/15). Em segundo lugar, a condição de ótimo local não se confirmou: o teor observado (≈ 5,70 mg/mL) foi 13,4% inferior ao predito e equivalente a respostas obtidas em pontos centrais do design. Ambas as condições apresentaram viés sistemático de superestimação pelo modelo, mas com magnitudes substancialmente diferentes.

A discrepância entre os dois pontos confirmatórios permite reinterpretar a topologia real da superfície de resposta. A configuração inicialmente sugerida pelo modelo, dois máximos competindo em vértices opostos, com aparência de sela, mostrou-se artefato da extrapolação do modelo quadrático em regiões com curvatura

subestimada. A superfície real apresenta um único ótimo prático, situado na região de baixa potência, baixa a moderada temperatura e tempo prolongado, sendo o ótimo local de alta potência uma predição inflada decorrente da ausência de termos quadráticos negativos significativos capazes de penalizar adequadamente os extremos. Esse comportamento é coerente com o padrão de degradação por cavitação prolongada em alta potência discutido na seção anterior.

Um achado adicional emergiu da comparação entre as condições (270, 50, 15), executada no planejamento original ($Y = 6,50$ mg/mL), e (270, 20, 15), executada na validação ($Y = 6,52$ mg/mL): as respostas são estatisticamente equivalentes. Isso indica que, na região de baixa potência e tempo prolongado, a temperatura entre 20 e 50 °C não exerce efeito relevante sobre o teor de antocianinas extraídas. Do ponto de vista de processo, esse resultado é particularmente vantajoso, pois confere robustez à extração quanto a flutuações térmicas e possibilita operação em temperaturas mais baixas, reduzindo simultaneamente o consumo energético e o risco de degradação térmica dos compostos bioativos.

5.5.6. Definição das Condições Operacionais Ótimas

Com base no conjunto de resultados, significância dos efeitos identificados pela ANOVA, validação experimental favorável da condição predita e evidência empírica de robustez térmica entre 20 e 50 °C, adotaram-se como condições operacionais ótimas para a extração assistida por ultrassom de antocianinas do sistema LAT:GLY:CIT/*H. sabdariffa* os seguintes parâmetros: potência de sonicação de 270 W, temperatura de 30 °C e tempo de sonicação de 15 minutos. A temperatura intermediária de 30 °C foi selecionada como compromisso entre eficiência energética e estabilidade dos compostos bioativos, dentro da faixa de equivalência estatística identificada. Essas condições foram empregadas para a produção do lote de extrato utilizado nas etapas subsequentes de caracterização química e encapsulação.

A análise crítica dos resultados ressalta uma limitação metodológica relevante: a ausência de curvatura significativa no modelo indica que a janela experimental adotada não comporta o verdadeiro ótimo matemático do sistema, situado provavelmente em regiões adjacentes (potências inferiores a 270 W e/ou tempos superiores a 15 min). Contudo, a equivalência empírica observada entre os pontos (270, 50, 15) e (270, 20, 15) sugere que o sistema se encontra em região de saturação

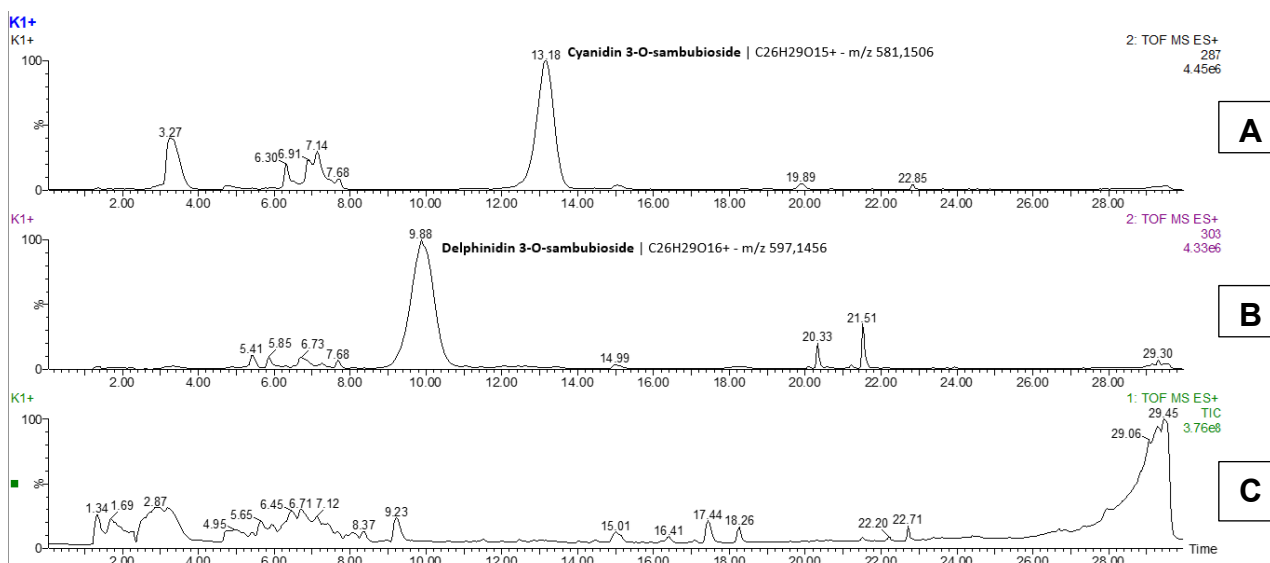
cinética, na qual ganhos marginais adicionais seriam pequenos e potencialmente acompanhados de degradação dos compostos bioativos. Por essa razão, optou-se por não conduzir uma segunda rodada experimental, sendo a condição obtida considerada suficiente para os objetivos da presente pesquisa.

5.6. Caracterização Química

5.6.1. UPLC-QToF-MS/MS

O perfil cromatográfico do extrato de *H. sabdariffa* foi avaliado por cromatografia de fase reversa acoplada a MS. A delphinidina possui um grupo hidroxila adicional no anel B (posição C5') em relação à cianidina, o que confere à delphinidina-3-O-sambubiosídeo maior polaridade e, conseqüentemente, menor retenção na fase estacionária apolar. Por isso, esse derivado elui antes da cianidina-3-O-sambubiosídeo, padrão amplamente relatado para extratos de *H. sabdariffa* analisados por cromatografia em fase reversa [111,112].

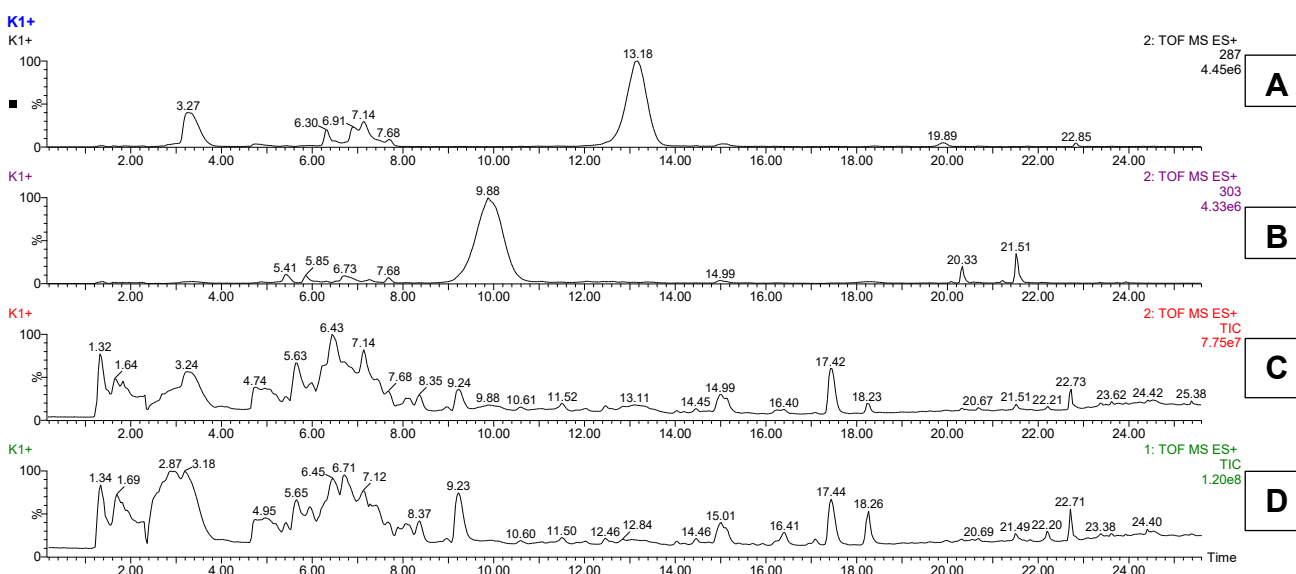
Figura 13: Perfil cromatográfico obtido por UPLC-QToF-MS/MS (modo ESI⁺) do extrato NADES de *H. sabdariffa*.



Fonte: O Autor (2026). Os painéis (A) e (B) correspondem aos cromatogramas de íons extraídos (EIC, Function 2 — alta energia de colisão) das antocianinas majoritárias identificadas: Cianidina-3-O-sambubiosídeo ([M+H]⁺ = m/z 581,1506; íon fragmento m/z 287; t_R = 13,18 min) e Delphinidina-3-O-sambubiosídeo ([M+H]⁺ = m/z 597,1456; íon fragmento m/z 303; t_R = 9,88 min), respectivamente. O painel (C) apresenta o cromatograma de íons totais (TIC, Function 1 — baixa energia de colisão) da amostra.

Os cromatogramas de íons totais (TIC) revelaram um perfil químico complexo, com numerosos sinais minoritários distribuídos ao longo da corrida e sinais intensos de eluição tardia (em torno de 29 min). Tais sinais tardios são compatíveis com constituintes menos polares e com componentes da própria matriz eutética (HBA/HBD do NADES) e da lavagem da coluna, não correspondendo às antocianinas-alvo. A presença de múltiplos picos minoritários é esperada, uma vez que o cálice de *H. sabdariffa* é uma matriz rica em ácidos orgânicos (ácido hibístico e ácido hidroxicítrico), ácidos fenólicos (ácido clorogênico e isômeros, ácido protocatecuico) e flavonóis glicosilados (derivados de quercetina e kaempferol), os quais são habitualmente coextraídos e descritos na literatura [111,113].

Figura 14: Perfil de aquisição MSe por UPLC-QToF-MS/MS (modo ESI⁺) do extrato NADES de *H. sabdariffa*



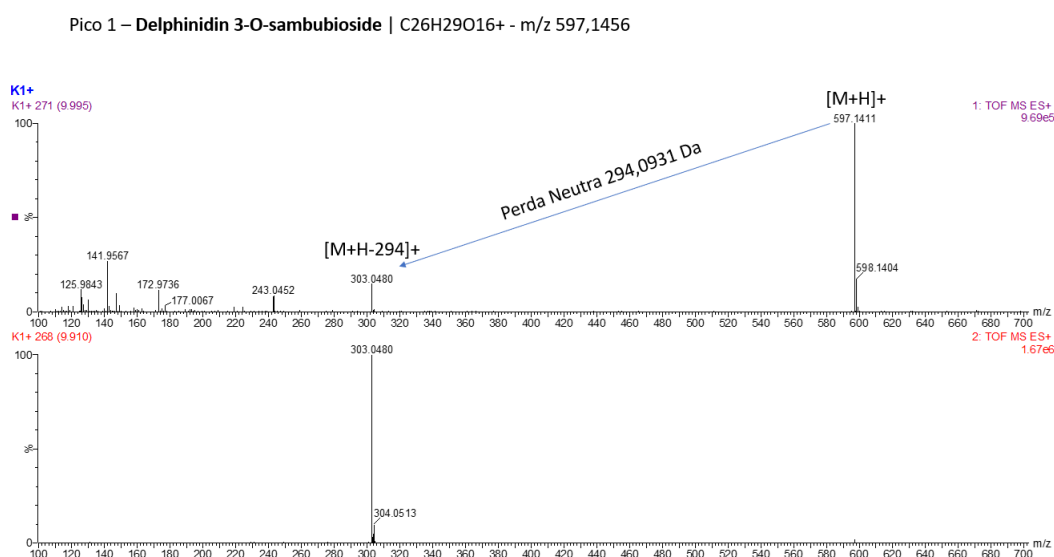
Fonte: O Autor (2026). Os painéis (A) e (B) correspondem aos EICs (Function 2 — alta energia de colisão) das antocianinas majoritárias Cianidina-3-O-sambubiosídeo ($[M+H]^+ = m/z 581,1506$; íon fragmento $m/z 287$; $t_R = 13,18$ min) e Delfinidina-3-O-sambubiosídeo ($[M+H]^+ = m/z 597,1456$; íon fragmento $m/z 303$; $t_R = 9,88$ min), respectivamente. Os painéis (C) e (D) exibem os cromatogramas de íons totais (TIC) das Function 2 (alta energia — íons fragmento) e Function 1 (baixa energia — íons precursores), respectivamente, ilustrando o perfil químico global do extrato nas duas condições de energia de colisão adquiridas simultaneamente.

5.6.2. Identificação Estrutural pelo Espectro de Massas

5.6.2.1. Pico 1 – Delfinidina-3-O-sambubiosídeo

Na função de baixa energia, o espectro adquirido no ápice do Pico 1 ($t_R \approx 9,9$ min) apresentou como sinal de maior m/z o íon molecular $[M]^+$ em m/z 597,1411, acompanhado de seu isótopo m/z 598,1404. O valor experimental aproxima-se do calculado para a fórmula $C_{26}H_{29}O_{16}^+$ (m/z teórico 597,1456), correspondendo a um erro de massa de $-7,54$ ppm. Já a função de alta energia exibiu como pico-base o íon-produto em m/z 303,0480, atribuído ao cátion delfinidina (aglicona, $C_{15}H_{11}O_7^+$).

Figura 15: Espectros de massas de alta resolução obtidos por UPLC-QToF-MS/MS (modo ESI⁺) da Delfinidina 3-O-sambubiosídeo identificada em extrato NADES de *H. sabdariffa*



Fonte: O Autor (2026). ($t_R = 9,995$ min). O espectro de varredura (survey scan, TOF MS ES⁺, painel superior) exibe o íon pseudomolecular $[M+H]^+$ em m/z 597,1411 (calculado para $C_{26}H_{29}O_{16}^+$: 597,1456; $\Delta = -7,5$ ppm). O espectro de fragmentação (product ion scan, MS/MS ES⁺, painel inferior) apresenta o íon produto $[M+H-294]^+$ em m/z 303,0480, resultante de perda neutra de 294,0931 Da correspondente ao resíduo dissacarídico sambubiosídeo (2-O- β -D-xilopiranosil- β -D-glicose), com geração da aglicona delfinidina protonada.

A relação entre o precursor e a aglicona é definida por uma perda neutra de 294,0931 Da (valor teórico 294,0950 Da), atribuída à clivagem da unidade dissacarídica sambubiose ($C_{11}H_{18}O_9$), constituída por uma glicose ligada a uma xilose. Essa perda corresponde, em termos sequenciais, à eliminação de uma hexose (162 Da, glicose) seguida de uma pentose (132 Da, xilose), conforme $[M-294]^+$. O conjunto, íon molecular em m/z 597, perda característica de 294 Da e aglicona delfinidina em m/z 303, é diagnóstico e permite identificar o Pico 1 atribuído como delfinidina-3-O-sambubiosídeo, em identificação com alta confiabilidade com o padrão de fragmentação descrito para a antocianina majoritária do hibisco [113,114]

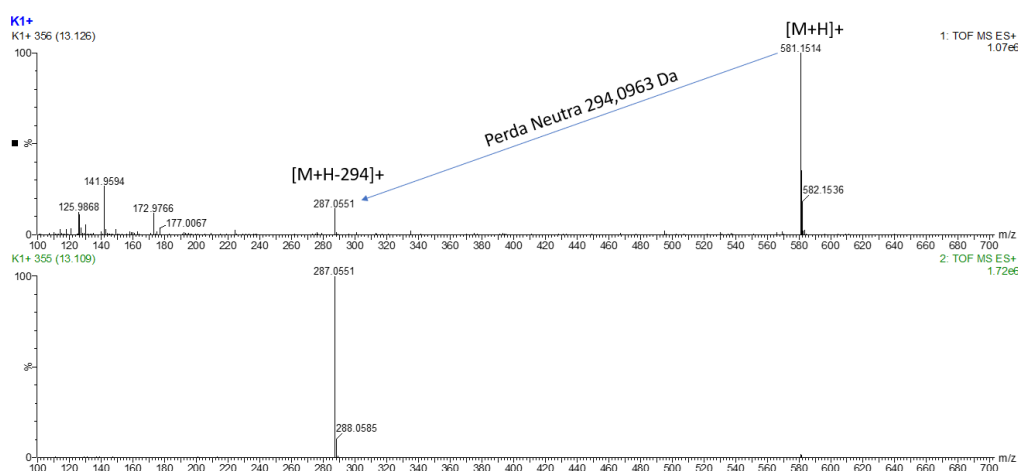
5.6.2.2. Pico 2 – Cianidina-3-O-sambubiosídeo

O Pico 2 ($t_R \approx 13,1$ min) apresentou, na função de baixa energia, o íon molecular $[M]^+$ em m/z 581,1514 (isótopo em m/z 582,1536), valor consistente com a fórmula $C_{26}H_{29}O_{15}^+$ (m/z teórico 581,1506; erro de +1,38 ppm). Na função de alta energia, o pico-base correspondeu ao íon-produto em m/z 287,0551, atribuído ao cátion cianidina ($C_{15}H_{11}O_6^+$; erro de apenas +0,3 ppm).

Novamente, a diferença de massa de 294 Da entre o precursor (m/z 581) e a aglicona (m/z 287) corresponde à eliminação da sambubiose, confirmando a presença do mesmo dissacarídeo na posição C3. Assim, o Pico 2 é atribuído à cianidina-3-O-sambubiosídeo. Os dois compostos identificados — delphinidina-3-O-sambubiosídeo e cianidina-3-O-sambubiosídeo — são reconhecidamente as duas antocianinas majoritárias e os marcadores quimiotaxonômicos característicos de *H. sabdariffa*, responsáveis pela intensa coloração vermelha dos cálices [114-116].

Figura 16: Espectros de massas de alta resolução obtidos por UPLC-QToF-MS/MS (modo ESI⁺) da Cianidina 3-O-sambubiosídeo identificada em extrato NADES de *H. sabdariffa*

Pico 2 – Cyanidin 3-O-sambubioside | $C_{26}H_{29}O_{15}^+$ - m/z 581,1506



Fonte: O Autor (2026). ($t_R = 13,126$ min). O espectro de varredura (survey scan, TOF MS ES⁺, painel superior) exibe o íon pseudomolecular $[M+H]^+$ em m/z 581,1514 (calculado para $C_{26}H_{29}O_{15}^+$: 581,1506; $\Delta = +1,4$ ppm). O espectro de fragmentação (product ion scan, MS/MS ES⁺, painel inferior) apresenta o íon produto $[M+H-294]^+$ em m/z 287,0551, resultante de perda neutra de 294,0963 Da atribuída ao resíduo sambubiosídeo, com liberação da aglicona cianidina protonada.

5.6.2.3. Precisão de Massa e Confiabilidade

A confiança na identificação fundamenta-se na convergência de múltiplas evidências independentes, e não apenas na exatidão de massa. Para a cianidina-3-O-sambubiosídeo, tanto o íon molecular (m/z 581,1514; +1,38 ppm) quanto a aglicona

(m/z 287,0551; +0,3 ppm) situaram-se dentro da janela de ± 5 ppm usualmente adotada como critério de identificação por espectrometria de massas de alta resolução (HRMS). Para a delfinidina-3-O-sambubiosídeo, observou-se um leve desvio negativo sistemático (-7,54 ppm para o íon molecular e cerca de -6 ppm para a aglicona em m/z 303,0480). Esse desvio, ligeiramente superior à janela ideal, pode ser atribuído a um pequeno deslocamento local de calibração na região de menor intensidade do espectro do Pico 1 (o íon molecular da delfinidina-3-O-sambubiosídeo foi registrado com intensidade de $9,69 \times 10^5$, inferior à do Pico 2). Ainda assim, a atribuição permanece inequívoca: a fórmula elementar é compatível, a perda neutra de 294 Da é altamente diagnóstica da sambubiose e a aglicona corresponde exatamente à delfinidina.

5.6.2.4. Valor Diagnóstico do Padrão de Fragmentação

A perda neutra de 294 Da constitui a assinatura espectral central deste extrato. Em ambos os picos, a transição do íon molecular para a aglicona ($[M-294]^+$) ocorre sem a observação de um íon intermediário de perda parcial (por exemplo, perda isolada de 132 ou 162 Da), o que é coerente com a clivagem do dissacarídeo sambubiose como unidade única ligada glicosidicamente na posição C3. A obtenção da aglicona como pico-base na função de alta energia, em contraposição à predominância do íon molecular na função de baixa energia, demonstra a eficácia da aquisição MS^E em estabelecer a relação precursor–produto e reforça a anotação. Esse comportamento reproduz fielmente os relatos para o hibisco em que delfinidina (3) e cianidina (3) glicosiladas com sambubiose geram, respectivamente, os íons m/z 597 $\rightarrow$ 303 e m/z 581 $\rightarrow$ 287 [11,114]

Os sinais de baixa massa observados nos espectros (por exemplo, m/z 125,98; 141,96; 172,98 e 177,01) apresentam intensidades reduzidas e padrão isotópico não característico de fragmentos de antocianinas, sendo provavelmente atribuíveis a ruído químico, adutos inorgânicos ou contribuições da matriz/solvente; sendo assim, não foram, portanto, considerados informativos para a elucidação estrutural dos pigmentos.

5.6.2.5. Implicações para a Extração por NADES

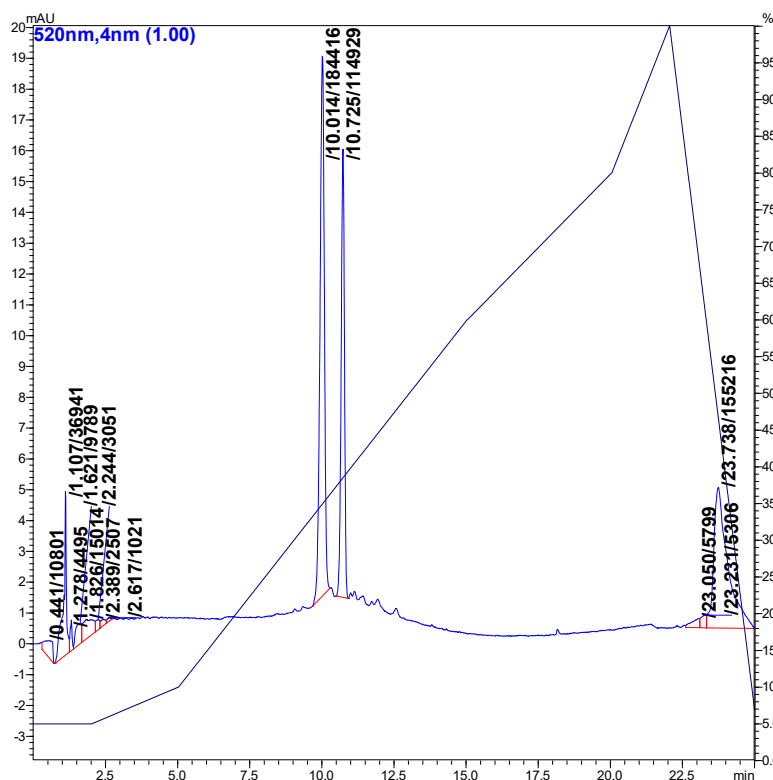
A detecção das duas antocianinas-marcadoras do hibisco confirma que o sistema eutético natural ácido (LAT:GLY:CIT) foi eficaz na recuperação seletiva dos pigmentos de interesse, corroborando os resultados de teor de antocianinas totais que indicaram esse sistema como o mais eficiente da triagem. A natureza ácida do NADES contribui em dois níveis: favorece a transferência de massa durante a extração assistida por ultrassom e estabiliza as antocianinas na forma de cátion flávio, deslocando o equilíbrio de hidratação para longe das formas incolores (hemicetal/chalcona) e preservando os pigmentos durante o processamento e a análise [112,115]. A coextração de ácidos fenólicos e flavonóis, sugerida pelos sinais minoritários e bem documentada para a espécie [111,117], é desejável do ponto de vista funcional, pois esses compostos atuam como copigmentos e antioxidantes complementares, podendo contribuir para a estabilização das antocianinas no sistema de liberação subsequente baseado em hidrogel de HPMC.

Em síntese, a caracterização por HPLC–ESI–QTOF–MS validou a identidade botânica e química do extrato eutético de *H. sabdariffa*, demonstrando a presença majoritária de delphinidina-3-O-sambubiosídeo e cianidina-3-O-sambubiosídeo. Esses resultados fornecem a base molecular necessária para as etapas subsequentes do trabalho, sustentando o monitoramento dessas moléculas-alvo ao longo da incorporação ao hidrogel de HPMC e dos ensaios de estabilidade e liberação.

5.6.3. Análise por HPLC-DAD

O monitoramento a 520 nm, comprimento de onda diagnóstico do cromóforo flavílio das antocianinas, revelou um perfil dominado por dois picos majoritários e bem resolvidos, eluindo a t_R 10,014 min (área 184.416) e t_R 10,725 min (área 114.929), conforme mostrado na **Figura 17**. Esses dois sinais concentram a quase totalidade da resposta espectrofotométrica na região do visível, correspondendo a 61,6% e 38,4% da soma das duas áreas, respectivamente. Os demais sinais registrados ($t_R < 2,7$ min e $t_R \approx 23$ min) apresentam baixa relevância: os primeiros eluem próximos ao volume morto, na região de elevada polaridade do gradiente (componentes da matriz/frente de solvente), e os tardios situam-se na zona de lavagem com 100% de metanol e reequilíbrio, sendo atribuíveis a perturbações de linha de base do gradiente, não a antocianinas (espécies glicosídicas polares que não eluem em fase móvel fortemente orgânica).

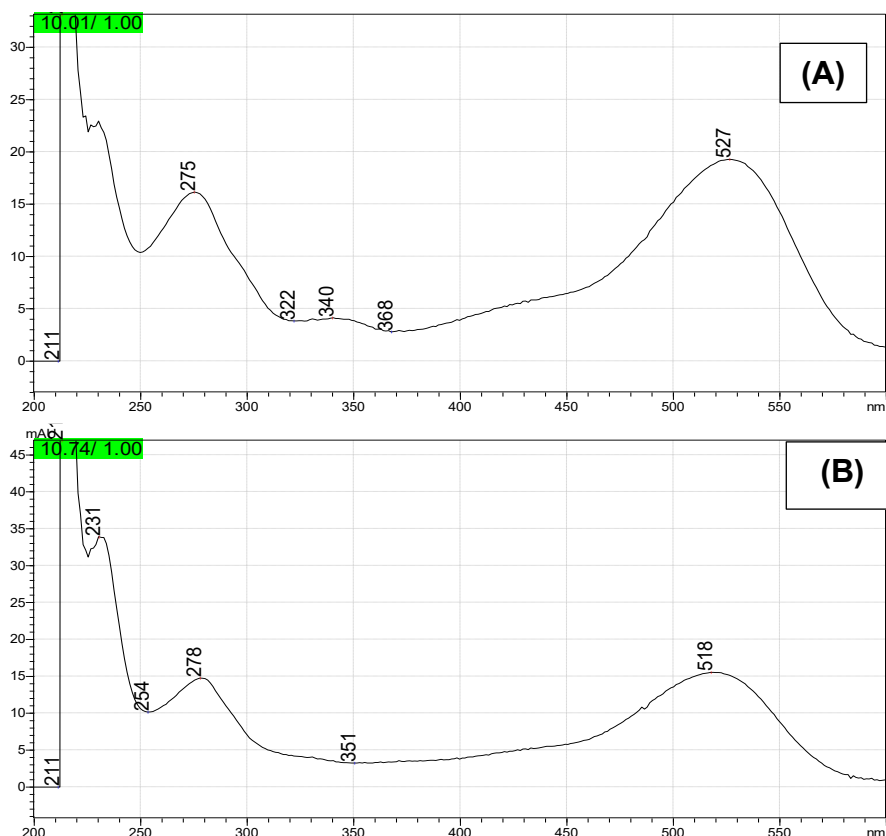
Figura 17: Cromatograma obtido por HPLC-DAD (520 nm) do extrato NADES de *H. sabdariffa*



Fonte: O Autor (2026). Os picos majoritários em $t_R = 10,01$ min e $t_R = 10,74$ min correspondem às antocianinas Delfinidina-3-O-sambubiosídeo e Cianidina-3-O-sambubiosídeo, respectivamente, identificadas por comparação com os dados de UPLC-QToF-MS/MS. A curva em preto representa o gradiente de fase móvel aplicado durante a análise.

A confirmação da natureza antociânica apoia-se nos espectros UV-Vis extraídos (**Figura 18**) no ápice de cada pico, que exibem o duplo máximo característico desses pigmentos: a Banda II na região do UV (~275–278 nm), associada ao sistema benzoílico do anel A, e a Banda I na região do visível (510–530 nm), associada ao sistema cinamoílico/anel B do cátion flavílio. A ausência de uma banda intensa de acilação na faixa de 310–335 nm indica antocianinas não aciladas.

Figura 18: Espectros de absorção UV-Vis obtidos pelo detector de arranjo de diodos (DAD) para os picos majoritários do extrato *NADES* de *H. sabdariffa*



Fonte: O Autor (2026). (A) Espectro do pico em $t_R = 10,01$ min, com $\lambda_{max} = 527$ nm, característico da Delphinidina-3-O-sambubiosídeo. (B) Espectro do pico em $t_R = 10,74$ min, com $\lambda_{max} = 518$ nm, característico da Cianidina-3-O-sambubiosídeo. O deslocamento batocrômico observado entre os dois compostos (+9 nm) é atribuído à presença do grupo hidroxila adicional no anel B da delphinidina em comparação à cianidina.

O par de picos majoritários a 520 nm é coerente, em todos os critérios cromatográficos e espectrais, com as duas antocianinas características de *H. sabdariffa*: a delphinidina-3-O-sambubiosídeo (D3S) e a cianidina-3-O-sambubiosídeo (C3S). Tais sambubiosídeos são, de modo consensual na literatura, os pigmentos predominantes dos cálices da espécie, com D3S geralmente como componente mais

abundante e C3S como o segundo majoritário [111,112]. Os sambubiosídeos correspondem a 3-O-glicosídeos cuja unidade dissacarídica (sambubiose = 2-O- β -D-xilopiranosil-D-glicose) encontra-se ligada exclusivamente na posição C3 da aglicona [111]

A distinção entre as duas agliconas apoia-se na posição da Banda I no visível. O pico 1 ($\lambda_{\text{máx}}$ 527 nm) é compatível com um derivado de delfinidina, cuja trihidroxilação do anel B (3',4',5'-OH) amplia a conjugação e desloca batocromicamente a absorção, ao passo que o pico 2 ($\lambda_{\text{máx}}$ 518 nm) corresponde a um derivado de cianidina (anel B 3',4'-OH), de absorção visível menos deslocada. A diferença de ~9 nm entre os dois máximos reflete exatamente o efeito do número de hidroxilas do anel B sobre o cromóforo flavílio, padrão amplamente descrito para as antocianinas do hibisco e usado como critério de identificação por DAD [1,3]. O perfil da Banda II (~275–278 nm) e a ausência de absorção acentuada na faixa de acilação (310–335 nm) confirmam tratar-se de pigmentos não acilados, em conformidade com a estrutura sambubiosídica

A ordem de eluição observada, D3S antes de C3S, está de acordo com o comportamento esperado em fase reversa (coluna T3/C18): a delfinidina, por possuir uma hidroxila adicional no anel B, é mais polar e, portanto, menos retida que a cianidina, eluindo primeiro. Esse mesmo ordenamento foi relatado em métodos por HPLC-DAD e LC-ESI-MS para extratos de cálices da espécie [111,114]. A maior área do pico de D3S ($\approx$ 1,6 vez a de C3S) é igualmente consistente com a predominância de D3S reportada para o hibisco; ressalva-se, contudo, que áreas obtidas em um único comprimento de onda refletem a resposta espectrofotométrica (dependente do coeficiente de absorvidade molar de cada aglicona a 520 nm) e não devem ser tomadas como razão molar absoluta sem curvas de calibração específicas [111,112].

A combinação das duas plataformas é metodologicamente robusta porque cada técnica privilegia uma fração distinta do extrato. As antocianinas são cátions flavílio e, por isso, são detectadas e quantificadas de modo ótimo pelo DAD a 520 nm, como evidenciado pelo perfil limpo do par D3S/C3S. Já a aquisição por UPLC-QToF-MS/MS em modo negativo (ESI⁻) favorece a ionização dos ácidos orgânicos e fenólicos e dos flavonóis, fornecendo a impressão digital química complementar do extrato [113,114]. Para fins de confirmação por massas, a literatura reporta, em modo positivo, o íon flavílio [M]⁺ em m/z 597 para a D3S (C₂₆H₂₉O₁₆⁺) e em m/z 581 para a C3S

(C₂₆H₂₉O₁₅⁺), ambos liberando o fragmento da aglicona por perda neutra de 294 Da (sambubiose), com m/z 303 (delfinidina) e m/z 287 (cianidina), respectivamente [114,116].

5.6.4. Espectrometria FTIR

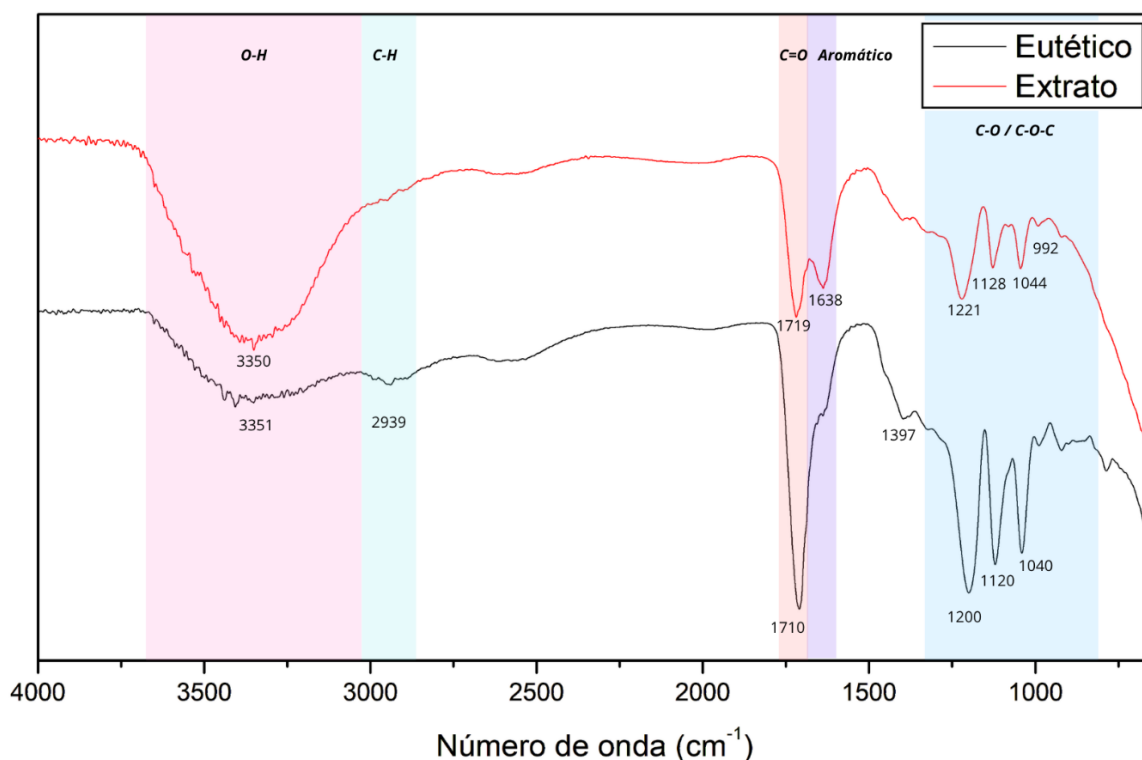
A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada (FTIR-ATR) foi empregada para elucidar a composição funcional do solvente eutético profundo natural (NADES) formulado a partir de ácido láctico, ácido cítrico e glicerol (LAT:CIT:GLY), bem como para investigar as interações estabelecidas entre esse solvente e os compostos extraídos dos cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. Os espectros foram adquiridos na faixa de 650 a 4000 cm⁻¹ e, para fins de discussão, convertidos de absorbância para transmitância e normalizados. As principais bandas identificadas em ambas as amostras, com suas respectivas atribuições, estão sumarizadas na **Tabela 12** e ilustrados na **Figura 19**.

Tabela 12. Bandas de absorção observadas nos espectros de FTIR-ATR do NADES e do extrato de *Hibiscus sabdariffa* em NADES, com as respectivas atribuições vibracionais.

NADES (cm ⁻¹)	Extrato (cm ⁻¹)	Modo vibracional	Atribuição
3406	3350	v(O–H)	Estiramento O–H de hidroxilas em ligação de hidrogênio (ácidos, glicerol, fenóis, água)
2939	~2930	v(C–H)	Estiramento C–H alifático (CH ₂ , CH ₃)
2617	—	v(O–H) dímero	Sobretom do dímero carboxílico cíclico (residual no NADES; ausente no extrato)
1710	1719	v(C=O)	Estiramento C=O de ácido carboxílico (láctico/cítrico)
—	1638	v(C=C)	C=C aromático e cátion flavílio das antocianinas (banda nova no extrato)
1397	1399	δ(O–H)/δ(C–H)	Deformação angular de O–H carboxílica e C–H
1280	1280	v(C–O)	Estiramento C–O de carboxila
1200	1221	v(C–O)	Estiramento C–O carboxílico/fenólico
1120	1128	v(C–O)	C–O de álcool secundário / C–O–C glicosídico
1040	1044	v(C–O)	C–O de álcool primário (glicerol)
921	900	δ aromático	Deformação fora do plano de C–H aromático

v: estiramento; δ : deformação angular.

Figura 19: Espectro de FTIR do NADES e do extrato NADES de *H. sabdariffa*



Fonte: O Autor (2026).

O espectro do NADES é dominado por uma banda larga e intensa centrada em 3406 cm^{-1} , atribuída ao estiramento O–H das hidroxilas dos componentes. O alargamento acentuado dessa banda, substancialmente superior ao observado em hidroxilas livres, constitui a assinatura espectroscópica clássica da formação do eutético, decorrente do estabelecimento de uma extensa rede de ligações de hidrogênio entre o aceptor e os doadores de hidrogênio [37,118]. Esse comportamento é consistente com o relatado para sistemas eutéticos de ácido cítrico e glicerol, nos quais o deslocamento e o alargamento das bandas de O–H e C=O confirmam as interações de hidrogênio e eletrostáticas responsáveis pela depressão do ponto de fusão [37].

A banda de estiramento C=O das carboxilas dos ácidos láctico e cítrico foi observada em 1710 cm^{-1} . Essa posição é inferior à esperada para o grupo carbonila de um ácido carboxílico monomérico livre (em torno de 1760 cm^{-1}), indicando que a carbonila atua como aceptor de ligações de hidrogênio em um ambiente fortemente associado [118]. Investigações estruturais de eutéticos à base de ácido cítrico por

espectroscopia vibracional e modelagem molecular demonstraram que tanto os grupos carboxila quanto as hidroxilas participam de uma rede tridimensional de interações não covalentes, corroborando o deslocamento observado [118].

Um achado relevante refere-se à região de 2500–2700 cm^{-1} , onde se localiza o sobretom característico do dímero cíclico de ácidos carboxílicos. No espectro do NADES, essa banda (em torno de 2617 cm^{-1}) apresentou intensidade reduzida, sugerindo que as associações diméricas ácido–ácido foram majoritariamente substituídas por interações ácido–glicerol durante a formação do eutético. Esse mecanismo é coerente com o papel do glicerol como doador de hidrogênio multidentado, capaz de estabelecer múltiplas pontes simultâneas devido à presença de três grupos hidroxila [37, 119]. As bandas de estiramento C–O observadas em 1120 cm^{-1} (álcool secundário) e 1040 cm^{-1} (álcool primário) reforçam essa interpretação, ao evidenciarem ambientes químicos distintos para as hidroxilas do glicerol, compatíveis com seu engajamento diferenciado na rede supramolecular [37].

O espectro do extrato de *Hibiscus sabdariffa* em NADES preserva o esqueleto vibracional do solvente, o que era esperado dada a sua proporção majoritária no sistema. Contudo, três alterações diagnósticas indicam a efetiva incorporação dos compostos bioativos. Em primeiro lugar, a banda de O–H em 3350 cm^{-1} tornou-se mais larga e intensa em relação ao NADES puro, o que é atribuível ao incremento de grupos hidroxila provenientes das antocianinas, dos ácidos fenólicos e dos açúcares coextraídos da matriz vegetal. Os cálices de *H. sabdariffa* são reconhecidamente ricos em delphinidina-3-O-sambubiosídeo e cianidina-3-O-sambubiosídeo, antocianinas que apresentam múltiplas hidroxilas fenólicas e resíduos glicosídicos passíveis de interação por ligações de hidrogênio [120, 112].

Em segundo lugar, observou-se o surgimento de uma banda em 1638 cm^{-1} , ausente no espectro do NADES puro. Essa absorção é atribuída ao estiramento C=C de anéis aromáticos e ao cátion flavílio das antocianinas, que predomina em meio ácido, condição garantida pela presença dos ácidos láctico e cítrico no solvente. O aparecimento dessa banda é amplamente reconhecido na literatura como evidência da presença de antocianinas em extratos e matrizes poliméricas [121,122]. Estudos de extração de antocianinas de *H. sabdariffa* com solventes eutéticos à base de ácido cítrico relataram comportamento espectral análogo, com a manutenção das bandas características dos pigmentos após a extração [119,121].

Em terceiro lugar, a banda de estiramento C=O deslocou-se de 1710 cm^{-1} (no NADES) para 1719 cm^{-1} (no extrato). Esse deslocamento sugere uma modificação no ambiente eletrônico das carbonilas, decorrente de novas interações entre os ácidos do solvente e as hidroxilas fenólicas dos compostos extraídos. Deslocamentos e alargamentos de bandas dessa natureza são interpretados como indicadores diretos de formação de ligações de hidrogênio entre antocianinas e moléculas vizinhas, conforme demonstrado em sistemas de copigmentação antocianina–biopolímero [8]. As bandas na região de $1000\text{--}1130\text{ cm}^{-1}$, associadas a estiramentos C–O–C glicosídicos, também se mostraram modificadas no extrato, o que é compatível com a presença dos resíduos de sambubiose das antocianinas e de outros carboidratos coextraídos [120].

O conjunto de evidências espectrais sustenta a hipótese de que as antocianinas extraídas estão integradas à rede de ligações de hidrogênio do NADES, e não meramente dissolvidas. A formação dessas interações entre as hidroxilas fenólicas dos pigmentos e os componentes do solvente reduz a disponibilidade dos grupos reativos para reações de degradação, como hidrólise glicosídica, oxidação e abertura do anel pirílico [8,112]. Esse mecanismo de estabilização tem sido apontado como uma das principais vantagens dos NADES sobre os solventes convencionais na recuperação de antocianinas de *H. sabdariffa* [119,8, 122]. A natureza ácida conferida pelos ácidos láctico e cítrico contribui adicionalmente para a estabilidade, ao deslocar o equilíbrio das antocianinas para a forma de cátion flavílio, mais estável e responsável pela coloração avermelhada do extrato [112, 10].

Em resumo, a análise por FTIR-ATR confirmou a formação do sistema eutético LAT:CIT:GLY por meio de uma densa rede de ligações de hidrogênio e forneceu evidências consistentes da incorporação das antocianinas de *Hibiscus sabdariffa* ao solvente. O surgimento da banda em 1638 cm^{-1} , o reforço da banda de O–H e o deslocamento da carbonila constituem, em conjunto, a assinatura espectroscópica da interação solvente–soluto, fundamentando o uso do NADES como meio simultaneamente extrator e estabilizante desses pigmentos.

5.7. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO HIDROGEL

5.7.1. pH

No presente trabalho, quatro formulações de hidrogel à base de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) foram desenvolvidas com composições distintas, visando à incorporação de antocianinas extraídas de *Hibiscus sabdariffa* L. por meio de NADES. Os valores de pH obtidos para as formulações GP1, GP2, GT1 e GT2 foram, respectivamente, 6,32; 3,34; 2,72 e 2,81 (**Tabela 14**). A análise desses valores revela um gradiente de acidez coerente com a natureza química dos componentes incorporados em cada formulação, cujas contribuições são discutidas a seguir.

Tabela 14: Formulações de hidrogéis de HPMC

FORMULAÇÃO	HPMC (%)	PG (%)	NADES (%)	EXT. HIBISCO (%)	H ₂ O	PH
GP1	3	5	-	-	90	6,32
GP2	3	5	-	3	89	3,34
GT1	3	-	8	-	89	2,72
GT2	3	-	-	8	89	2,81

Fonte: O Autor (2026)

A formulação GP1, composta exclusivamente por HPMC (3%), propilenoglicol (PG, 5%) e água (92%), apresentou pH de 6,32. Esse valor é consistente com o comportamento amplamente descrito na literatura para soluções aquosas de HPMC sem a presença de componentes ativos ou excipientes ionizáveis. A HPMC é um derivado semissintético não iônico da celulose, cuja natureza química confere ao polímero inércia ácido-base em solução aquosa, ou seja, na ausência de outros componentes, o pH do sistema reflete essencialmente a qualidade da água utilizada.

, Đorđević et al. [124] demonstraram que géis de HPMC em concentrações de 2–5% (m/m) exibem pH próximo da neutralidade, funcionando primariamente como agente gelificante e modificador reológico sem exercer capacidade tamponante ou acidificante significativa sobre o sistema. O valor de 6,32 obtido para GP1 valida, portanto, o comportamento esperado da matriz base e serve como referência para quantificar a contribuição acidificante dos demais componentes nas formulações GP2, GT1 e GT2.

O propilenoglicol, empregado a 5% nas formulações GP, é classificado como essencialmente neutro ($pK_a > 14$), atuando predominantemente como co-solvente, umectante e potencializador de permeação cutânea, sem interferência mensurável no

pH do sistema. Heikkinen e colaboradores demonstram que o PG não modifica o pH de formulações tópicas, mas altera a mobilidade dos lipídios do estrato córneo, ampliando a difusão de compostos polares como as antocianinas. [125,126]

A incorporação de 3% de extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa* L. à formulação GP2 resultou em pH de 3,34, redução de aproximadamente 3 unidades em relação à formulação-base GP1 (pH 6,32). Essa variação expressiva, apesar da baixa proporção de extrato incorporado, é atribuída à elevada concentração de ácidos orgânicos de baixo pKa naturalmente presentes nos cálices de hibisco: ácido hibístico, ácido protocatecuico, ácido cítrico (pKa1 $\approx$ 3,13), ácido málico (pKa1 $\approx$ 3,46) e ácido clorogênico, além das antocianinas majoritárias cianidina-3-O-sambubiosídeo e delfinidina-3-O-sambubiosídeo. [127,6]

A grande variação de pH provocada por apenas 3% de extrato decorre da natureza logarítmica da escala de pH. O extrato de hibisco, com pH medido em 1,4, apresenta concentração de H⁺ de aproximadamente $3,98 \times 10^{-2}$ mol/L, um valor cerca de 80.000 vezes superior ao da formulação-base GP1 ([H⁺] $\approx$ $4,79 \times 10^{-7}$ mol/L). Ao se adicionar 3% desse extrato ao sistema, a concentração de H⁺ da mistura é dominada pela contribuição ácida do extrato, resultado matematicamente equivalente a um pH calculado de aproximadamente 2,92 pela abordagem de mistura de concentrações de H⁺. O valor experimental de 3,34 situa-se acima dessa estimativa simples, o que é fisicamente esperado em razão da capacidade tamponante parcial da matriz polimérica de HPMC e das interações entre os grupos hidroxila da cadeia celulósica e os ácidos do extrato.

Do ponto de vista da estabilidade das antocianinas, o pH de 3,34 obtido para GP2 representa uma condição favorável. Sinela et al. [6] demonstraram que as antocianinas de hibisco apresentam maior estabilidade em meio ácido, com retenção significativa de cor e atividade antioxidante em valores de pH entre 2,5 e 4,0, faixa na qual o cátion flavílio (AH⁺) coexiste em equilíbrio com quantidades ainda reduzidas de pseudobase carbinol. Estudos de Morales-Castro et al. [127] corroboram que extratos aquosos de cálices de hibisco acidificam o meio naturalmente para valores de pH entre 2,5 e 3,5, dependendo da concentração e do processo de extração, confirmando a coerência do valor obtido para GP2.

A formulação GT1, contendo 8% do NADES LAT:GLY:CIT (ácido láctico: glicerol:ácido cítrico, proporção molar 1:1:1) e ausência de extrato vegetal, registrou

pH de 2,72 — o menor valor entre as quatro formulações. Esse resultado reflete diretamente o caráter ácido pronunciado do solvente eutético profundo natural selecionado, cujos componentes ionizáveis incluem o ácido láctico ($pK_a \approx 3,86$) e o ácido cítrico ($pK_{a1} \approx 3,13$; $pK_{a2} \approx 4,76$; $pK_{a3} \approx 6,40$), ao passo que o glicerol ($pK_a > 14$) é neutro e não contribui para a acidez do sistema. [7]

Koh et al. [37], ao caracterizarem sistemas NADES à base de ácidos orgânicos, verificaram que NADES contendo ácido cítrico e ácido láctico como HBD produzem pH entre 2,0 e 3,5 em solução aquosa, dependendo da proporção de água adicionada. A adição de 20% de água em volume durante a síntese do NADES, relatada no presente estudo, atenua parcialmente a acidez do sistema eutético puro, mas não é suficiente para elevar o pH a valores próximos da neutralidade. Dib et al. [8] confirmaram, em estudo sobre o sistema GLY:LAC, que a estrutura supramolecular de ligações de hidrogênio do NADES é preservada com acréscimos de água de até 40%, mantendo a acidez do sistema praticamente inalterada nessa faixa, com variações de pH inferiores a 0,3 unidades.

A maior redução de pH observada em GT1 (2,72) em relação a GP2 (3,34), apesar de ambas as formulações empregarem proporções relativamente baixas de componente ácido (8% de NADES vs. 3% de extrato), decorre da diferença na concentração efetiva de H^+ de cada componente: o NADES LAT:GLY:CIT apresenta pH de 0,5 ($[H^+] \approx 3,16 \times 10^{-1} \text{ mol/L}$), muito mais ácido que o extrato de hibisco (pH 1,4; $[H^+] \approx 3,98 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$). A combinação de maior concentração e maior proporção de H^+ explica o pH mais baixo de GT1 em relação a GP2. Foroutani et al. [9] destacam que NADES à base de ácidos orgânicos exercem efeito acidificante direto sobre o meio, o que favorece a estabilização de antocianinas na forma de cátion flavílio e reduz a taxa de degradação hidrolítica dos pigmentos.

Do ponto de vista farmacotécnico, o pH de 2,72 situa as antocianinas da formulação GT1 integralmente na faixa de predominância do cátion flavílio (AH^+), confirmada para valores de pH abaixo de 3,0. Sadowska-Bartosz e Bartosz [23], enfatizam que o equilíbrio estrutural das antocianinas é fortemente dependente do pH: em $pH < 3$, o cátion flavílio é a espécie dominante, sendo a forma mais colorida, estável termicamente e com maior atividade antioxidante. A conversão para a pseudobase carbinol incolor inicia-se a partir de pH 4–5, tornando a manutenção da acidez do sistema crítica para a eficácia do sistema de entrega de antocianinas.

A formulação GT2, que incorpora 8% de extrato de *H. sabdariffa* obtido via NADES LAT:GLY:CIT, apresentou pH de 2,81 — valor ligeiramente superior ao de GT1 (2,72), porém inferior ao de GP2 (3,34). Esse comportamento é farmacotecnicamente coerente e pode ser interpretado à luz da interação entre os dois componentes acidificantes presentes no sistema: o NADES residual que acompanha o extrato e os ácidos orgânicos intrínsecos do hibisco.

A diferença de pH entre GT1 e GT2 ($\Delta = 0,09$ unidade) é pequena, mas mensurável, e indica que a incorporação do extrato vegetal em maior concentração (8%) introduz um componente adicional com capacidade tamponante, os ácidos orgânicos do hibisco e os compostos fenólicos presentes no extrato, que eleva discretamente o pH em relação à formulação contendo apenas o NADES. Zannou et al. [8] e Thakur et al. [45] demonstraram que antocianinas em NADES formam interações supramoleculares por pontes de hidrogênio com os componentes do solvente eutético, o que pode contribuir para uma redistribuição das espécies iônicas e uma leve modulação do pH efetivo do sistema. Esse efeito de copigmentação intermolecular, análogo ao descrito por Foroutani et al. [48], é responsável pela estabilização das antocianinas sem, contudo, alterar substancialmente o caráter ácido da formulação.

O pH de 2,81 em GT2 mantém as antocianinas na faixa de predominância do cátion flavílio, assegurando a estabilidade do pigmento e sua atividade antioxidante. O fato de GT2 apresentar pH ligeiramente superior ao de GT1, ainda que contenha maior proporção de material vegetal ácido, reforça a hipótese de que a matriz polimérica de HPMC exerce papel tamponante estrutural: ao redistribuir os ácidos livres na rede tridimensional do gel, o polímero atenua a resposta de pH do sistema em relação ao que seria esperado em solução simples. [124,128]

Embora os valores de pH das formulações GT1 (2,72) e GT2 (2,81) sejam ideais para a estabilização das antocianinas, é necessário contextualizar sua compatibilidade com o sítio de aplicação biológico previsto. O pH fisiológico da pele íntegra situa-se tipicamente entre 4,7 e 6,0, enquanto as mucosas oral e vaginal apresentam valores de 6,5–7,4 e 3,5–5,0, respectivamente. [129]

Formulações com pH inferior a 3,5 são comuns em produtos dermatológicos contendo alfa-hidroxiácidos (AHAs), como ácido glicólico e ácido láctico, reconhecidos por atuarem em pH entre 3,0 e 4,0 com perfil de segurança estabelecido para

aplicação cutânea. Martinović et al. [130], em estudo *in vivo* com voluntários humanos publicado no periódico Gels (MDPI), avaliaram géis à base de NADES contendo ácido málico, ácido cítrico e ácido tartárico e verificaram que formulações com pH na faixa de 3,0–4,0 não induziram irritação cutânea clinicamente relevante, e que os géis com NADES reduziram parâmetros de irritação induzida por dodecil sulfato de sódio, sugerindo potencial anti-inflamatório intrínseco. Os autores destacam que o caráter ácido dos NADES à base de AHAs é bem tolerado pela pele e pode promover efeitos benéficos adicionais, como a melhora da hidratação e a normalização do pH cutâneo em condições inflamatórias.

Para aplicações em mucosas mais sensíveis, como a mucosa oral, o ajuste do pH para a faixa entre 3,5 e 4,5 pode ser necessário, o que pode ser obtido por meio de tampões biocompatíveis como citrato ou acetato de sódio, em concentrações que não comprometam a estabilidade das antocianinas. Estudos complementares de tolerabilidade *in vivo* e ensaios de citotoxicidade são recomendados para definir a faixa de pH final mais adequada ao sítio terapêutico específico.

Em síntese, os valores de pH obtidos, GP1 (6,32), GP2 (3,34), GT1 (2,72) e GT2 (2,81) são coerentes com as propriedades físico-químicas dos componentes empregados e com o design das formulações. O pH de GP1 valida o comportamento neutro esperado para a matriz de HPMC, enquanto os valores de GP2, GT1 e GT2 refletem as contribuições acidificantes progressivas do extrato de hibisco e do NADES LAT:GLY:CIT. As formulações contendo NADES (GT1 e GT2) apresentam condições de pH mais favoráveis à estabilidade do cátion flavílio, forma predominante e farmacologicamente ativa das antocianinas. A compatibilidade dessas formulações com tecidos biológicos deve ser avaliada em etapas subsequentes, com atenção especial ao sítio de aplicação e à concentração dos componentes ácidos na formulação final.

5.7.2. Densidade

Em hidrogéis hidrofílicos, a densidade situa-se próxima à da água ($\approx 0,998$ g/mL a 20 °C), sendo modulada pela concentração de polímero, pela presença de solutos (fármacos, extratos, cossolventes) e pela quantidade de ar aprisionado na matriz [138].

Os valores das massas e as densidades relativa e absoluta estão apresentadas na **Tabela 15**. As médias por formulação na **Tabela 16**.

Tabela 15: Valores de massa e densidade relativa e absoluta

AMOSTRAS	MASSA (g)	DENSIDADE RELATIVA (adimensional)	DENSIDADE ABSOLUTA (g/cm³)
Picnômetro	141,876	-	
Água (20°C)	25,215	1,0000	0,9982
GP1	25,1509	0,997458	0,9957
GP2	24,7857	0,982974	0,9812
GT1	25,2685	1,002122	1,0003
GT2	24,7589	0,981912	0,9801

Fonte: O Autor (2026)

Figura 16: Médias das densidades

FORMULAÇÃO	DENSIDADE RELATIVA (MÉDIA)	DENSIDADE ABSOLUTA (MÉDIA)
GP (GP1, GP2)	0,9987±0,0073	0,9902±0,0072
GT (GT1, GT2)	1,0005±0,0102	0,9920±0,00101

Fonte: O Autor (2026)

Observa-se que todas as formulações apresentaram densidade muito próxima à da água (densidade relativa entre 0,982 e 1,002; densidade absoluta corrigida entre 0,980 e 1,000 g/mL), comportamento típico de hidrogéis hidrofílicos de elevado teor de água [131].

A HPMC é um derivado celulósico semissintético, biocompatível, não iônico, com excelente capacidade filmogênica e formadora de géis claros e estáveis, amplamente empregado em formas tópicas e de liberação modificada [131]. Seus géis exibem comportamento pseudoplástico (*shear-thinning*) e estrutura sustentada por extensa rede de ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila do polímero e a água. Quanto à densidade, Ozon e colaboradores reportaram valor de 0,976 g/mL para um gel de HPMC a 10 %, ou seja, ligeiramente inferior ao da água [131]. Esse padrão é coerente com os valores aqui obtidos (densidade relativa de 0,982–1,002), confirmando que a base de HPMC apresenta densidade próxima, e em geral

discretamente inferior, à da água, que é reflexo da rede polimérica hidratada e de eventual ar microaprisionado durante a homogeneização.

A incorporação de solutos eleva a densidade do gel. No mesmo estudo, os géis de HPMC carregados com fotossensibilizadores porfirínicos atingiram 1,15 e 1,26 g/mL, valores nitidamente superiores ao da base não carregada [131]. No caso de matrizes de HPMC contendo antocianinas, Akhtar e colaboradores demonstraram que ocorre ligação de hidrogênio entre os grupos –OH da HPMC e os das antocianinas, o que reduziu a permeabilidade ao oxigênio e estabilizou a matriz [132]. Tais interações são diretamente relevantes para o presente sistema, que veicula antocianinas de *Hibiscus sabdariffa*, pois afetam simultaneamente o empacotamento molecular (e, portanto, a densidade) e a estabilidade do pigmento.

Nos dados aqui analisados, contudo, a diferença entre as médias de GP e GT ($\approx 0,0018$ g/mL na densidade absoluta) é pequena e inferior à dispersão observada entre as réplicas, de modo que um eventual aumento de densidade atribuível ao extrato não é resolvido na precisão atual.

Os NADES são intrinsecamente mais densos que a água. Szali e colaboradores [133] mediram densidades de 1,20–1,22 g/cm³ para ChCl:glicerol e 1,16–1,19 g/cm³ para ChCl:ácido láctico, com aumento da densidade ao se elevar a proporção do doador de hidrogênio, em razão das ligações de hidrogênio mais fortes e do empacotamento molecular mais compacto. Ahmed e colaboradores [134] relataram densidades de 1,243–1,361 g/cm³ para NADES ternários à base de ureia–glicerol, associando os valores elevados a redes de ligações de hidrogênio altamente organizadas e a uma polaridade próxima à da água. De modo análogo, NADES à base de cloreto de colina e ácido láctico para extração de antocianinas exibem propriedades físico-químicas (densidade, polaridade e viscosidade) governadas pela natureza do doador de hidrogênio [135].

Do ponto de vista estrutural, Verger e colaboradores [136] demonstraram que a incorporação de 10 % (m/m) de NADES hidrofílicos (betaína–glicerol ou ácido cítrico–glicose) em hidrogéis de carboximetilcelulose aumentou a viscosidade em repouso e modificou o comportamento térmico do sistema (a calorimetria exploratória diferencial revelou a supressão do pico associado ao afrouxamento das cadeias do polímero), evidenciando que os NADES se integram à rede de ligações de hidrogênio polímero–água [88]. Essa reestruturação ocorre em paralelo ao aumento de

densidade, uma vez que o NADES preenche o espaço aquoso da rede com um líquido mais denso e mais estruturado.

Portanto, as formulações apresentaram densidades relativas de 0,9975 (GP1), 0,9830 (GP2), 1,0021 (GT1) e 0,9819 (GT2), e densidades absolutas de 0,9957, 0,9812, 1,0003 e 0,9801 g/mL, respectivamente, todas próximas à da água, em conformidade com o esperado para hidrogéis hidrofílicos de HPMC [131]. A literatura indica que a base de HPMC tem densidade discretamente inferior à da água e que tanto a incorporação de bioativos [131,132] quanto a de NADES [133–136] tendem a elevá-la, dado o caráter mais denso desses solventes eutéticos.

5.7.3. Teste de Espalhabilidade

Após a obtenção das quatro formulações (GP1, GP2, GT1 e GT2), foi realizado o teste de espalhabilidade. O ensaio foi conduzido sobre uma superfície nivelada, sobre a qual foram dispostos, sequencialmente, uma folha de papel milimetrado e uma placa de vidro. Para a deposição padronizada das amostras, utilizou-se um molde circular de alumínio com orifício central de 1,3 cm de diâmetro, posicionado sobre a placa de vidro, conforme a **Figura 20**. Uma alíquota de cada formulação foi transferida para o interior do orifício do molde, sendo este preenchido completamente e rasado para garantir a uniformidade do volume depositado. Após o preenchimento, o molde foi cuidadosamente removido de forma vertical, permitindo que o gel se espalhasse livremente sobre a superfície da placa de vidro.

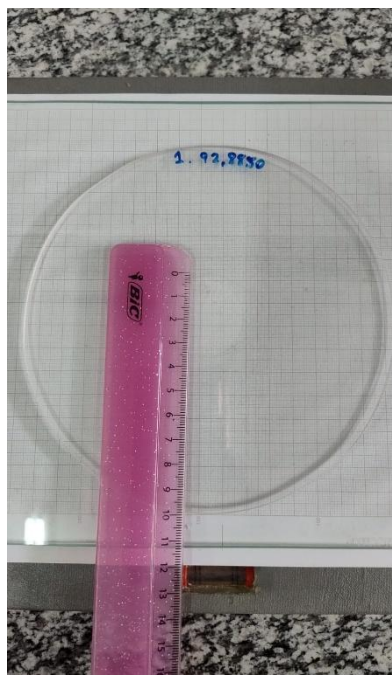
Figura 20: Preparação do teste de espalhabilidade



Fonte: O Autor (2026)

Em seguida, o Peso 1 foi posicionado sobre o gel e, após 1 minuto de acomodação, o diâmetro foi aferido com uma régua de 30 cm, conforme ilustra a **Figura 21**. O Peso 2 foi então adicionado sobre o Peso 1, mantendo a carga acumulada sobre o gel, aguardou-se novamente 1 minuto e, após a remoção temporária do Peso 2, o diâmetro foi medido e o peso reposicionado. Esse procedimento foi repetido de forma cumulativa para os demais pesos, de modo que cada nova medição foi realizada sob a soma de todas as cargas anteriores acrescida do novo peso, totalizando cargas progressivamente maiores a cada etapa.

Figura 21: Aferição do diâmetro do gel após acomodação sob carga



Fonte: O Autor (2026)

Após aferir os diâmetros do espalhamento dos géis, calculou-se a área de espalhamento, conforme descrito no item 4.7.4, pela equação:

$$E_i = \frac{d^2 \pi}{4} \text{ (Eq. 10)}$$

Onde,

E_i representa a espalhabilidade pelo peso e d representa o diâmetro médio dos géis. Os diâmetros obtidos por peso estão na **Tabela 16**

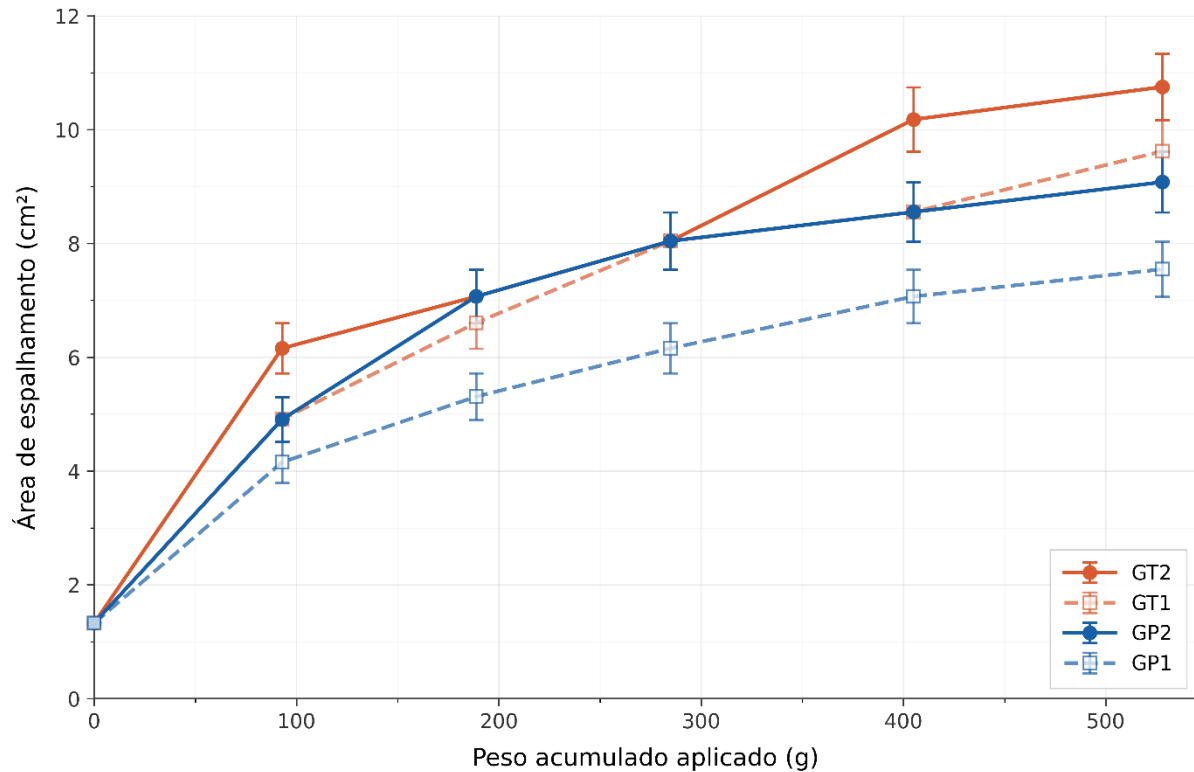
Tabela 16: Diâmetros dos géis obtidos após acomodação ao acúmulo de carga

PESO (g)	DIÂMETROS (cm)			
	GP1	GP2	GT1	GT2
Zero	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1
92,8850 (1)	2,3 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,8 ± 0,1
95,95 (2)	2,6 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,9 ± 0,1	3,0 ± 0,1
96,00 (3)	2,8 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,2 ± 0,1
120,1239 (4)	3,0 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,6 ± 0,1
123,03 (5)	3,1 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,7 ± 0,1

Fonte: O Autor (2026)

O padrão de espalhabilidade de cada formulação está ilustrado na **Figura 22**.

Figura 22: Gráfico de espalhabilidade dos géis de HPMC



Fonte: O Autor (2026)

Mesmo na ausência do extrato, o GT1 apresentou maior espalhabilidade do que o GP1 em todos os pesos, com diferença média de diâmetro de 0,32 cm (teste t pareado por peso, $p = 0,001$). Esse resultado indica diferença intrínseca de consistência entre as duas matrizes, atribuível a fatores como concentração de HPMC, massa molar do polímero ou grau de substituição metoxi/hidroxipropil, variáveis que governam a densidade da rede de ligações de hidrogênio e, portanto, a viscosidade do gel. A literatura sobre hidrogéis de HPMC demonstra que a viscosidade cresce de forma exponencial com o aumento da concentração do polímero, com correspondente redução da espalhabilidade, em razão do adensamento da rede tridimensional e da maior resistência ao fluxo [137,138]. Hidrogéis de HPMC exibem caracteristicamente comportamento pseudoplástico e tixotrópico, no qual a viscosidade aparente diminui com o aumento da taxa de cisalhamento, propriedade que sustenta a relação inversa observada entre consistência da matriz e área de espalhamento [131,138].

A adição do extrato obtido por NADES aumentou significativamente a espalhabilidade nas duas matrizes (TESTE: $p = 0,037$; PADRÃO: $p = 0,001$, teste t pareado por peso). Em termos de área, o ganho médio decorrente da incorporação do extrato situou-se entre 18 e 33% na base PADRÃO e foi mais variável (0 a 25%) na base TESTE. Esse comportamento é mecanisticamente coerente com a composição do NADES empregado: o glicerol e os ácidos orgânicos (lático e cítrico) atuam como plastificantes e umectantes na matriz celulósica. Plastificantes hidrofílicos portadores de grupos hidroxila inserem-se entre as cadeias do polímero e estabelecem ligações de hidrogênio com elas, ampliando o espaçamento intercadeias, reduzindo a coesão da rede e diminuindo a temperatura de transição vítrea, efeitos que se traduzem em menor viscosidade aparente e maior mobilidade do sistema [137,139,140].

O glicerol é, reconhecidamente, um dos plastificantes mais eficientes para matrizes de celulose e seus derivados, sendo amplamente empregado em filmes e revestimentos de HPMC justamente por reforçar a interação entre o polímero e a água e por promover o afrouxamento da rede polimérica [137,140,141]. No domínio dos sistemas eutéticos, misturas de cloreto de colina com glicerol ou com ácidos orgânicos já foram descritas como plastificantes verdes eficazes para amido, ágar, quitosana e celulose, conferindo flexibilidade e modulando as propriedades mecânicas dos materiais resultantes [138,142]. Especificamente em matrizes celulósicas hidrogel, demonstrou-se que NADES hidrofílicos, incluindo composições contendo glicerol e ácidos orgânicos, modificam de modo expressivo o perfil reológico e textural de géis de carboximetilcelulose, alterando a viscosidade e o equilíbrio entre os caracteres viscoso e elástico em função da concentração e da natureza química do solvente [136]. De maneira análoga, Filip e colaboradores [143] prepararam géis auto-montados baseados em NADES-HPC (hidroxipropilcelulose), usando NADES formados por conjugações de cloreto de colina com ureia, glicerol, ácido lático e ácido cítrico. Nesses géis, aumentos na fração de NADES levaram a maior módulo de armazenamento, redução da capacidade de intumescimento em água e microestrutura mais compacta, inferida por análises térmicas e mecânicas. Os autores concluíram que a incorporação de NADES em matrizes poliméricas reduz a viscosidade do sistema de forma controlável, em função da escolha do par HBA:HBD e da sua concentração, seguindo a ordem: HPC 14% > ChCl – Ac. Cítrico 29% > ChCl-

Glicerol 29% > ChCl-Ureia 29% > ChCl - Ác. Láctico 29%. Esse comportamento está diretamente ligado à densidade de ligações de hidrogênio de cada HBD (ácido cítrico: 4 doadores; glicerol: 3; ureia e ácido láctico: 2), mostrando que a natureza química do NADES é um parâmetro de controle da viscosidade final do hidrogel.[141], e formulações de hidrogel contendo NADES de cloreto de colina e ácido cítrico mostraram-se promissoras como veículos dermais sustentáveis [88].

É importante notar que o efeito do NADES sobre a reologia de matrizes celulósicas não é unidirecional e depende fortemente da concentração e da composição do solvente: enquanto baixas adições tendem a plastificar e fluidificar o sistema, teores mais elevados podem, ao contrário, aumentar a viscosidade em repouso por reforço da rede de ligações de hidrogênio [136]. No presente sistema, o resultado líquido foi de fluidificação, o que indica que a faixa de incorporação empregada favoreceu o efeito plastificante do glicerol e a contribuição dos ácidos orgânicos para o enfraquecimento das interações intercadeias da HPMC, sem comprometer a integridade macroscópica do gel, não foram observados sinais de sinérese, separação de fases ou colapso da rede ao longo do ensaio.

A análise de variância de dois fatores revelou efeito altamente significativo tanto do peso aplicado ($F = 145,4$; $p < 0,001$) quanto da formulação ($F = 63,5$; $p < 0,001$) sobre a área de espalhamento. Houve ainda interação significativa formulação $\times$ peso quando a resposta foi expressa em área ($F = 2,40$; $p = 0,019$), indicando que as quatro curvas não são paralelas e que o efeito da composição sobre a espalhabilidade depende da carga aplicada. A repetibilidade do ensaio foi adequada, com coeficientes de variação intragrupo entre 2,7 e 4,3%, abaixo do limite usualmente tolerado para o método.

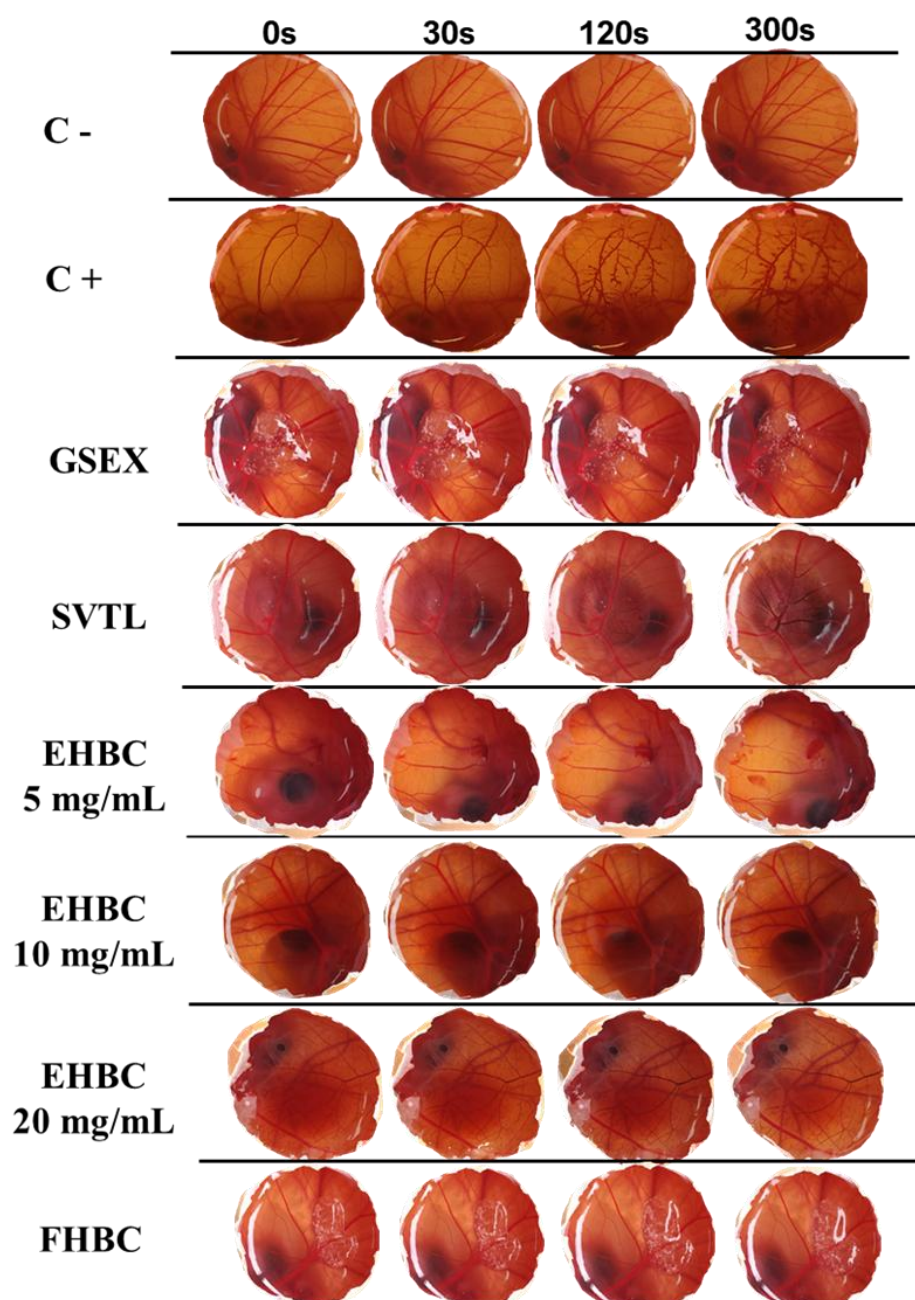
O ajuste das curvas seguiu predominantemente um modelo logarítmico ($S_i = a \cdot \ln P + b$), com coeficientes de determinação entre 0,98 e 0,99 para três das quatro formulações. Esse padrão é coerente com o comportamento viscoelástico esperado de géis de éteres de celulose, nos quais a área tende a um patamar à medida que a tensão de cisalhamento imposta pelas placas vence a tensão de cedência do sistema. A formulação GP2 foi a única a ajustar-se melhor a um modelo linear ($R^2 = 0,97$), sugerindo que essa amostra, a mais fluida do conjunto, ainda não havia atingido o patamar de saturação na faixa de pesos avaliada, o que aponta para a necessidade de estender o ensaio a cargas maiores em estudos futuros.

Em conjunto, os dados demonstram que (i) as formulações GT são intrinsecamente mais espalháveis que as GP; (ii) o extrato obtido por NADES LAT:GLY:CIT atua como plastificante, aumentando a espalhabilidade de ambas as matrizes de forma mais consistente na base GP; e (iii) o NADES permite igualar o perfil de espalhamento de uma base consistente ao de uma base fluida. A espalhabilidade, contudo, é uma medida macroscópica e indireta do comportamento de fluxo.

5.7.4. HET-CAM

Após a exposição da membrana corioalantóica de embrião de galinha com extrato de hibisco (EHBC) nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/mL, e o NADES puro, durante os intervalos de tempos de 0s a 300s, como um teste preliminar de segurança. Observou-se que houve hemorragias, lise vascular, coagulação e cauterização de vasos de forma discreta a grave. Porém, a formulação em gel com o extrato de hibisco (FHBC) e a formulação em gel sem o extrato não mostraram irritação ou dano vascular, conforme mostra a **Figura 23**. Então, há a necessidade de mais estudo sobre a formulação com a FHBC para saber a concentração do extrato do hibisco existente na formulação em gel e dosar o componente, o solvente, existente na formulação. Já que não se tem esses dados.

Figura 23: Teste de HET-CAM do NADES (SVTL), do extrato NADES de *H. sabdariffa* (EHBC) em diferentes concentrações e das formulações GP1 (GSEX) e GP2 (FHBC)



Fonte: O Autor (2026)

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Aurelio, D. L., Edgardo, R. G., & Navarro-Galindo, S. (2008). Thermal kinetic degradation of anthocyanins in a roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. cv. 'Criollo') infusion. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(2), 322-325.

[2] Vizzotto, M., Castilho, P. M., & Pereira, M. C. (2009). Compostos bioativos e atividade antioxidante em cálices de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.).

[3] Barros, I. B. I., & Wiest, J. M. (2010, August). A project by PLAMSUR: organic production of medicinal plants in African descendent communities in Southern Brazil. In XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): International Symposium on 921 (pp. 205-207).

[4] Alarcón-Alonso, J., Zamilpa, A., Aguilar, F. A., Herrera-Ruiz, M., Tortoriello, J., & Jimenez-Ferrer, E. (2012). Pharmacological characterization of the diuretic effect of *Hibiscus sabdariffa* Linn (Malvaceae) extract. *Journal of ethnopharmacology*, 139(3), 751-756.

[5] Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., & Heinrich, M. (2014). *Hibiscus sabdariffa* L.—A phytochemical and pharmacological review. *Food chemistry*, 165, 424-443.

[6] Sinela, A., Rawat, N., Mertz, C., Achir, N., Fulcrand, H., & Dornier, M. (2017). Anthocyanins degradation during storage of *Hibiscus sabdariffa* extract and evolution of its degradation products. *Food Chemistry*, 214, 234-241.

[7] Stănciuc, N., Turturică, M., Oancea, A. M., Barbu, V., Ioniță, E., Aprodu, I., & Râpeanu, G. (2017). Microencapsulation of anthocyanins from grape skins by whey protein isolates and different polymers. *Food and Bioprocess Technology*, 10, 1715-1726.

[8] Zannou, O., Koca, I., Aldawoud, T. M., & Galanakis, C. M. (2020). Recovery and stabilization of anthocyanins and phenolic antioxidants of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) with hydrophilic deep eutectic solvents. *Molecules*, 25(16), 3715.

[9] Türker, D. A., & Doğan, M. (2022). Ultrasound-assisted natural deep eutectic solvent extraction of anthocyanin from black carrots: Optimization, cytotoxicity, in-vitro bioavailability and stability. *Food and Bioprocess Technology*, 132, 99-113.

[10] Jovanović, M. S., Krgović, N., Živković, J., Stević, T., Zdunić, G., Bigović, D., & Šavikin, K. (2022). Ultrasound-assisted natural deep eutectic solvents extraction of bilberry anthocyanins: Optimization, bioactivities, and storage stability. *Plants*, 11(20), 2680.

[11] Fang, J. L., Luo, Y., Yuan, K., Guo, Y., & Jin, S. H. (2020). Preparation and evaluation of an encapsulated anthocyanin complex for enhancing the stability of anthocyanin. *Lwt*, 117, 108543.

[12] Song, J., Yu, Y., Chen, M., Ren, Z., Chen, L., Fu, C., ... & Li, Z. (2022). Advancement of protein-and polysaccharide-based biopolymers for anthocyanin encapsulation. *Frontiers in Nutrition*, 9, 938829.

[13] Fu, Z., Ju, H., Xu, G. S., Wu, Y. C., Chen, X., & Li, H. J. (2024). Recent development of carrier materials in anthocyanins encapsulation applications: a comprehensive literature review. *Food Chemistry*, 439, 138104.

[14] Sadiq, I. Z. (2023). Free radicals and oxidative stress: Signaling mechanisms, redox basis for human diseases, and cell cycle regulation. *Current molecular medicine*, 23(1), 13-35.

[15] Martemucci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D'andrea, L., Napolitano, P., & D'Alessandro, A. G. (2022). Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. *Oxygen*, 2(2), 48-78.

[16] Chaudhary, P., Janmeda, P., Docea, A. O., Yeskaliyeva, B., Abdull Razis, A. F., Modu, B., ... & Sharifi-Rad, J. (2023). Oxidative stress, free radicals and antioxidants: Potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. *Frontiers in chemistry*, 11, 1158198.

[17] Rauf, A., Khalil, A. A., Awadallah, S., Khan, S. A., Abu-Izneid, T., Kamran, M., ... & Wilairatana, P. (2024). Reactive oxygen species in biological systems: Pathways, associated diseases, and potential inhibitors—A review. *Food science & nutrition*, 12(2), 675-693.

[18] Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141(2), 312-322.

[19] Cheung, J. C. T., Deng, G., Wong, N., Dong, Y., & Ng, S. S. M. (2022). More than a duologue: In-depth insights into epitranscriptomics and ferroptosis. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 982606.

[20] Saini, N., Anmol, A., Kumar, S., Wani, A. W., Bakshi, M., & Dhiman, Z. (2024). Exploring phenolic compounds as natural stress alleviators in plants-a comprehensive review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 102383.

[21] Albuquerque, B. R., Heleno, S. A., Oliveira, M. B. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2021). Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. *Food & function*, 12(1), 14-29.

[22] Mutha, R. E., Tatiya, A. U., & Surana, S. J. (2021). Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: An overview. *Future journal of pharmaceutical sciences*, 7, 1-13.

[23] Sadowska-Bartos, I., & Bartosz, G. (2024). Antioxidant activity of anthocyanins and anthocyanidins: a critical review. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(22), 12001.

[24] Lu, Z., Wang, X., Lin, X., Mostafa, S., Zou, H., Wang, L., & Jin, B. (2024). Plant anthocyanins: Classification, biosynthesis, regulation, bioactivity, and health benefits. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109268.

[25] Wang, J., Zhao, Y., Sun, B., Yang, Y., Wang, S., Feng, Z., & Li, J. (2024). The structure of anthocyanins and the copigmentation by common micromolecular copigments: A review. *Food Research International*, 176, 113837.

[26] Liu, Y., Tikunov, Y., Schouten, R. E., Marcelis, L. F., Visser, R. G., & Bovy, A. (2018). Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in Solanaceous vegetables: a review. *Frontiers in chemistry*, 6, 52.

[27] Liu, Y., Qian, J., Li, J., Xing, M., Grierson, D., Sun, C., ... & Chen, K. (2022). Hydroxylation decoration patterns of flavonoids in horticultural crops: Chemistry, bioactivity, and biosynthesis. *Horticulture Research*, 9, uhab068.

[28] Koss-Mikołajczyk, I., & Bartoszek, A. (2023). Relationship between chemical structure and biological activity evaluated in vitro for six anthocyanidins most commonly occurring in edible plants. *Molecules*, 28(16), 6156.

[29] Xue, H., Zhao, J., Wang, Y., Shi, Z., Xie, K., Liao, X., & Tan, J. (2024). Factors affecting the stability of anthocyanins and strategies for improving their stability: A review. *Food Chemistry: X*, 101883.

[30] Ellis, L. R., Zulfiqar, S., Holmes, M., Marshall, L., Dye, L., & Boesch, C. (2022). A systematic review and meta-analysis of the effects of Hibiscus sabdariffa on blood pressure and cardiometabolic markers. *Nutrition reviews*, 80(6), 1723-1737.

[31] Salem, M. A., Zayed, A., Beshay, M. E., Abdel Mesih, M. M., Ben Khayal, R. F., George, F. A., & Ezzat, S. M. (2021). Hibiscus sabdariffa L.: phytoconstituents, nutritive, and pharmacological applications. *Advances in Traditional Medicine*, 1-11.

[32] Jamrozik, D., Borymska, W., & Kaczmarczyk-Żebrowska, I. (2022). *Hibiscus sabdariffa* in diabetes prevention and treatment—Does it work? An evidence-based review. *Foods*, 11(14), 2134.

[33] Montalvo-González, E., Villagrán, Z., González-Torres, S., Iñiguez-Muñoz, L. E., Isiordia-Espinoza, M. A., Ruvalcaba-Gómez, J. M., Arteaga-Garibay, R. I., Acosta, J. L., González-Silva, N., & Anaya-Esparza, L. M. (2022). Physiological Effects and Human Health Benefits of *Hibiscus sabdariffa*: A Review of Clinical Trials. *Pharmaceuticals*, 15(4), 464.

[34] Villa, C., Caviglia, D., Robustelli della Cuna, F. S., Zuccari, G., & Russo, E. (2024). NaDES Application in Cosmetic and Pharmaceutical Fields: An Overview. *Gels*, 10(2), 107.

[35] Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., & Tambyrajah, V. (2003). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical communications*, (1), 70-71.

[36] Socas-Rodríguez, B., Santana-Mayor, Á., Herrera-Herrera, A. V., & Rodríguez-Delgado, M. Á. (2020). Deep eutectic solvents. In *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science* (pp. 123-177). Elsevier.

[37] Koh, Q. Q., Kua, Y. L., Gan, S., Tan, K. W., Lee, T. Z. E., Cheng, W. K., & Lau, H. L. N. (2023). Sugar-based natural deep eutectic solvent (NADES): Physicochemical properties, antimicrobial activity, toxicity, biodegradability and potential use as green extraction media for phytonutrients. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 35, 101218.

[38] Kovács, A., Neyts, E. C., Cornet, I., Wijnants, M., & Billen, P. (2020). Modeling the physicochemical properties of natural deep eutectic solvents. *ChemSusChem*, 13(15), 3789-3804.

[39] Chevé-Kools, E., Choi, Y. H., Roullier, C., Ruprich-Robert, G., Grougnet, R., Chapeland-Leclerc, F., & Hollmann, F. (2025). Natural deep eutectic solvents (NaDES): green solvents for pharmaceutical applications and beyond. *Green Chemistry*.

[40] Choi, Y. H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I. W., ... & Verpoorte, R. (2011). Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology?. *Plant physiology*, 156(4), 1701-1705.

[41] Lin, S., Meng, X., Tan, C., Tong, Y., Wan, M., Wang, M., ... & Ma, Y. (2022). Composition and antioxidant activity of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* extracted using an ultrasonic-microwave-assisted natural deep eutectic solvent extraction method. *Ultrasonics Sonochemistry*, 89, 106102.

[42] Wang, D., Zhang, M., Law, C. L., & Zhang, L. (2024). Natural deep eutectic solvents for the extraction of lentinan from shiitake mushroom: COSMO-RS screening and ANN-GA optimizing conditions. *Food Chemistry*, 430, 136990.

[43] Milošević, S., Markovinović, A. B., Teslić, N., Mišan, A., Pojić, M., Karačonji, I. B., ... & Pavlić, B. (2024). Use of natural deep eutectic solvent (NADES) as a green extraction of antioxidant polyphenols from strawberry tree fruit (*Arbutus unedo* L.): An optimization study. *Microchemical journal*, 200, 110284.

[44] Lin, S., Meng, X., Tan, C., Tong, Y., Wan, M., Wang, M., ... & Ma, Y. (2022). Composition and antioxidant activity of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* extracted using an ultrasonic-microwave-assisted natural deep eutectic solvent extraction method. *Ultrasonics Sonochemistry*, 89, 106102.

[45] Thakur, R., Gupta, V., Ghosh, T., & Das, A. B. (2022). Effect of anthocyanin-natural deep eutectic solvent (lactic acid/fructose) on mechanical, thermal, barrier, and pH-sensitive properties of polyvinyl alcohol based edible films. *Food Packaging and Shelf Life*, 33, 100914.

[46] da Silva, D. T., Pauletto, R., da Silva Cavaleiro, S., Bochi, V. C., Rodrigues, E., Weber, J., ... & Emanuelli, T. (2020). Natural deep eutectic solvents as a biocompatible tool for the extraction of blueberry anthocyanins. *Journal of food composition and analysis*, 89, 103470.

[47] Santos-Martín, M., Cubero-Cardoso, J., González-Domínguez, R., Cortés-Trivino, E., Sayago, A., Urbano, J., & Fernández-Recamales, Á. (2023). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from blueberry leaves using natural deep

eutectic solvents (NADES) for the valorization of agrifood wastes. *Biomass and Bioenergy*, 175, 106882

[48] Foroutani, Z., Mogaddam, M. R. A., Ghasempour, Z., & Ghareaghajlou, N. (2024). Application of deep eutectic solvents in the extraction of anthocyanins: Stability, bioavailability, and antioxidant property. *Trends in Food Science & Technology*, 144, 104324..

[49] Ma, P., Li, Z., Jin, Y., Zuo, J., Zhang, Y., Dong, A., ... & Burenjargal, M. (2024). Green and efficient extraction process of flavonoids from sea buckthorn fruits by natural deep eutectic solvents aided with ultrasound. *Microchemical Journal*, 205, 111265.

[50] Panić, M., Damjanović, A., Radošević, K., Cvjetko Bubalo, M., Dujmić, F., Škegro, M., ... & Brnčić, M. (2024). Enhanced Preparative-Scale Extraction from Graševina Grape Pomace Using Ultrasound-Assisted Extraction and Natural Deep Eutectic Solvents. *Applied Sciences*, 14(14), 6185.

[51] Iannone, A., Sapone, V., Di Paola, L., Cicci, A., & Bravi, M. (2021). Extraction of anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) skins employing natural deep eutectic solvents (NaDES). *Chemical Engineering Transactions*, 87, 469-474.

[52] Jovanović, M. S., Krgović, N., Radan, M., Ćujić-Nikolić, N., Mudrić, J., Lazarević, Z., & Šavikin, K. (2023). Natural deep eutectic solvents combined with cyclodextrins: A novel strategy for chokeberry anthocyanins extraction. *Food Chemistry*, 405, 134816.

[53] Koraqi, H., Aydar, A. Y., Pandiselvam, R., Qazimi, B., Khalid, W., Petkoska, A. T., ... & Rustagi, S. (2024). Optimization of extraction condition to improve blackthorn (*Prunus spinosa* L.) polyphenols, anthocyanins and antioxidant activity by natural deep eutectic solvent (NADES) using the simplex lattice mixture design method. *Microchemical Journal*, 200, 110497.

[54] Balan, N., Măntăilă, S., Râpeanu, G., & Stănciuc, N. (2025). Enhanced Extraction of Bioactive Compounds from Red Grape Pomace: Optimizing Ultrasound-Assisted Extraction with Ethanol and NaDES as Solvents. *Antioxidants*, 14(5), 526.

[55] Gerçek, Y. C., Kutlu, N., Çelik, S., Bayram, S., Kirkıncı, S., & Bayram, N. E. (2025). Optimized ultrasonic-NADES extraction of anthocyanins, polyphenolics, and organic acids from chokeberry fruit with blueness and antimicrobial evaluation. *Microchemical Journal*, 113061.

[56] Krgović, N., Jovanović, M. S., Nedeljković, S. K., Šavikin, K., Lješković, N. J., Ilić, M., ... & Menković, N. (2025). Natural deep eutectic solvents extraction of anthocyanins—effective method for valorisation of black raspberry (*Rubus occidentalis* L.) pomace. *Industrial Crops and Products*, 223, 120237.

[57] Sportiello, L., Tolve, R., Grassi, F., Zanoni, M., Simonato, B., & Favati, F. (2025). Eco-friendly extraction of anthocyanins compounds from red radicchio by-products with natural deep eutectic solvents. *European Food Research and Technology*, 251(2), 179-191.

[58] Maia, N. M. A., Andressa, I., Cunha, J. S., Costa, N. D. A., Borges, L. L. R., Fontes, E. A. F., ... & Vieira, É. N. R. (2025). Optimization of Ultrasound-Assisted Obtention of Bluish Anthocyanin Extracts from Butterfly Pea (*Clitoria ternatea*) Petal Powders Using Natural Deep Eutectic Solvents. *Plants*, 14(7), 1042.

[59] Zannou, O., Koca, I., Tahergorabi, R., & Ibrahim, S. A. (2025). Bioavailability and purification of anthocyanins extracted from blackberry fruit using deep eutectic solvent. *Industrial Crops and Products*, 230, 121069.

[60] Alsaidi, R., & Thiemann, T. (2025). Use of Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) in Food Science and Food Processing. *Sustainability*, 17(5), 2293.

[61] Kumar, K., Srivastav, S., & Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics sonochemistry*, 70, 105325.

[62] Sethi, S., & Rathod, V. K. (2025). Recent advances in ultrasound-assisted extraction of natural products using novel solvents: a mini-review. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 48, 101132.

[63] Szpisják-Gulyás, N., Al-Tayawi, A. N., Horváth, Z. H., László, Z., Kertész, S., & Hodúr, C. (2023). Methods for experimental design, central composite design and

the Box–Behnken design, to optimise operational parameters: A review. *Acta Alimentaria*, 52(4), 521-537.

[64] Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977.

[65] Nair, A. T., Makwana, A. R., & Ahammed, M. M. (2014). The use of response surface methodology for modelling and analysis of water and wastewater treatment processes: a review. *Water science and technology*, 69(3), 464-478.

[66] Beg, S., & Akhter, S. (2021). Box–Behnken designs and their applications in pharmaceutical product development. *Design of experiments for pharmaceutical product development: volume I: basics and fundamental principles*, 77-85.

[67] Sabaghi, M., Tavasoli, S., Hoseyni, S. Z., Mozafari, M. R., Degraeve, P., & Katouzian, I. (2022). A critical review on approaches to regulate the release rate of bioactive compounds from biopolymeric matrices. *Food chemistry*, 382, 132411.

[68] Thang, N. H., Chien, T. B., & Cuong, D. X. (2023). Polymer-based hydrogels applied in drug delivery: an overview. *Gels*, 9(7), 523.

[69] Zagórska-Dziok, M., & Sobczak, M. (2020). Hydrogel-based active substance release systems for cosmetology and dermatology application: A review. *Pharmaceutics*, 12(5), 396.

[70] Farasati Far, B., Safaei, M., Nahavandi, R., Gholami, A., Naimi-Jamal, M. R., Tamang, S., ... & Huh, Y. S. (2024). Hydrogel encapsulation techniques and its clinical applications in drug delivery and regenerative medicine: A systematic review. *ACS omega*, 9(27), 29139-29158.

[71] Lin, C. C., & Metters, A. T. (2006). Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. *Advanced drug delivery reviews*, 58(12-13), 1379-1408.

[72] Fan, Y., Han, Q., Li, H., Cai, X., Dyett, B., Qiao, R., ... & Zhai, J. (2025). Recent Developments in Nanoparticle-Hydrogel Hybrid Materials for Controlled Release. *Advanced Science*, 12(35), e07209.

[73] Clegg, J. R., Adebowale, K., Zhao, Z., & Mitragotri, S. (2024). Hydrogels in the clinic: An update. *Bioengineering & translational medicine*, 9(6), e10680.

[74] Kaur, N., Choudhary, P., & Jaiswal, A. K. (2025). Recent progress in bioactive loaded hydrogels for food applications. *Journal of agriculture and food research*, 20, 101756.

[75] Zaitoon, A., & Lim, L. T. (2022). Triggered and controlled release of bioactives in food applications. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 100, pp. 49-107). Academic Press.

[76] Zou, P., Yao, J., Cui, Y. N., Zhao, T., Che, J., Yang, M., ... & Gao, C. (2022). Advances in cellulose-based hydrogels for biomedical engineering: a review summary. *Gels*, 8(6), 364.

[77] Santhamoorthy, M., & Kim, S. C. (2025). A review of the development of biopolymer hydrogel-based scaffold materials for drug delivery and tissue engineering applications. *Gels*, 11(3), 178. <https://doi.org/10.3390/gels11030178>

[78] Siepmann, J., & Siepmann, F. (2001). Mathematical modeling of drug delivery. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*, 48(2–3), 139–157. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00112-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00112-0)

[79] Amanzholkyzy, A., Zhumagaliyeva, S., Sultanova, N., Abilov, Z., Ongalbek, D., Donbayeva, E., Niyazbekova, A., & Mukazhanova, Z. (2025). Hydrogel delivery systems for biological active substances: Properties and the role of HPMC as a carrier. *Molecules*, 30(6), 1354. <https://doi.org/10.3390/molecules30061354>

[80] Vlad, R.-A., Pinte, A., Pinte, C., Rédei, E.-M., Antonoaea, P., Bîrsan, M., & Ciurba, A. (2025). Hydroxypropyl methylcellulose — A key excipient in pharmaceutical drug delivery systems. *Pharmaceutics*, 17(6), 784. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17060784>

[81] Kim, J. K., Kim, H. J., Chung, J.-Y., Lee, J.-H., Young, S.-B., & Kim, Y.-H. (2011). Sol-gel behavior of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) in ionic media including drug release. *Materials*, 4(10), 1861–1880. <https://doi.org/10.3390/ma4101861>

[82] Gómez-Mascaraque, L. G., & López-Rubio, A. (2025). Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) in sustainable pharmaceutical synthesis – Mechanistic insights, green metrics and outlook. *Results in Chemistry*, 2025, Article 101695. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2024.101695>

[83] Villa, C., Caviglia, D., Robustelli della Cuna, F. S., Zuccari, G., & Russo, E. (2024). NaDES application in cosmetic and pharmaceutical fields: An overview. *Gels*, 10(2), 107. <https://doi.org/10.3390/gels10020107>

[84] Deshmukh, K., Ahamed, M. B., Deshmukh, R. R., Pasha, S. K., Bhagat, P. R., & Chidambaram, K. (2017). Biopolymer composites with high dielectric performance: interface engineering. In *Biopolymer composites in electronics* (pp. 27-128). Elsevier.

[85] Perez-Robles, S., Carotenuto, C., & Minale, M. (2022). HPMC hydrogel formation mechanisms unveiled by the evaluation of the activation energy. *Polymers*, 14(3), 635. <https://doi.org/10.3390/polym14030635>

[86] Pan, P., Svirskis, D., Waterhouse, G. I. N., & Wu, Z. (2023). Hydroxypropyl methylcellulose bioadhesive hydrogels for topical application and sustained drug release: The effect of polyvinylpyrrolidone on the physicomechanical properties of hydrogel. *Pharmaceutics*, 15(9), 2360. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092360>

[87] Kichou, H., Huang, N., Ardeza, I.-M., *et al.* (2024). Effects of hydrophilic natural deep eutectic solvents on the rheological, textural, and sensory properties of carboxymethylcellulose-based cosmetic hydrogels. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 12(18), 7187–7199. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.4c01866>

[88] Hasanpour, F., Budai-Szűcs, M., Kovács, A., Ambrus, R., Jójárt-Laczko, O., Szalai, B., Pavlić, B., Simon, P., Törteli, L., & Berkó, S. (2025). The role of natural deep eutectic solvents in a hydrogel formulation containing lidocaine. *Pharmaceutics*, 17(3), 324. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17030324>

[89] Mercadal, P. A., González, A., Beloqui, A., Tomé, L. C., Mecerreyes, D., Calderón, M., & Picchio, M. L. (2024). Eutectogels: The multifaceted soft ionic materials of tomorrow. *JACS Au*, 4(10), 3744–3758. <https://doi.org/10.1021/jacsau.4c00677>

- [90] Nicolau, A., Mutch, A. L., & Thickett, S. C. (2024). Applications of functional polymeric eutectogels. *Macromolecular Rapid Communications*, 45(21), e2400405. <https://doi.org/10.1002/marc.202400405>
- [91] Shaw, Z. L., Awad, M. N., Greaves, T. L., *et al.* (2024). Deep eutectic solvent eutectogels for delivery of broad-spectrum antimicrobials. *ACS Applied Bio Materials*, 7(3), 1429–1434. <https://doi.org/10.1021/acsabm.3c00971>
- [92] Xu, Y., Cui, J., Guo, B., Li, Z., Wang, W., & Li, W. (2024). Cellulose-based eutectogel electrolyte with high ionic conductivity for solid-state lithium-ion batteries. *Chemical Engineering Journal*, 491, 151783. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.151783>
- [93] Kumar, *et al.* (2025). Fabrication of sodium alginate–hydroxypropyl methylcellulose based bioadhesive eutectogel of eberconazole for improved anti-fungal activity. *Carbohydrate Polymers*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2025.006897>
- [94] Zhang, K., Huang, Y., Han, J., Li, Z., Wang, J., & Yang, S. (2026). Design and sensing applications of eutectogels: A review. *Materials*, 19(6), 1059. <https://doi.org/10.3390/ma19061059>
- [95] Hu, *et al.* (2025). Eutectogels: Recent advances and emerging biological applications. *Advanced Functional Materials*. <https://doi.org/10.1002/adfm.202425778>
- [96] Gupta, *et al.* (2025). Eutectogels: Recent advances, design strategies, and emerging applications in biotechnology. *Gels*, 11(12), 1013. <https://doi.org/10.3390/gels11121013>
- [97] Koh, Q. Q., Chew, Z. L., Zhao, Y., Kua, Y. L., Gan, S., Tan, K. W., ... & Lau, H. L. N. (2024). 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, 459-473.
- [98] Mar, J. M., da Silva, L. S., Lira, A. C., Kinupp, V. F., Yoshida, M. I., Moreira, W. P., ... & Sanches, E. A. (2020). Bioactive compounds-rich powders: Influence of different carriers and drying techniques on the chemical stability of the Hibiscus acetosella extract. *Powder Technology*, 360, 383-391.
- [99] Teixeira, L. N., Stringheta, P. C., & de Oliveira, F. A. (2008). Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. *Revista Ceres*, 55(4), 297-304.

- [100] Rowe, R. C., Sheskey, P. J., & Quinn, M. E. (Eds.). (2017). *Handbook of pharmaceutical excipients* (Vol. 6, pp. 94-96). London: Pharmaceutical press
- [101] de Oliveira Batistuzzo, J. A., Itaya, M., & Eto, Y. (2015). *Formulário médico-farmacêutico*. Tecnopress.
- [102] Knorst, M. T. (1991). Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. *Compositae* (marcela).
- [103] Lange, M. K., Heberlé, G., & Milão, D. (2009). Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de uma emulsão base não-iônica contendo resveratrol. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(1), 145-151.
- [104] Bhandare, S. D., & Deokar, G. S. (2022). Hen's Egg Test–chorioallantoic Membrane (HET-CAM) test method for examination of dermal or cutaneous irritation of ME. CP as a polymer. *World J Pharm Res*, 11(6), 645-676.
- [105] Alañón, M. E., Ivanović, M., Pimentel-Mora, S., Borrás-Linares, I., Arráez-Román, D., & Segura-Carretero, A. (2020). A novel sustainable approach for the extraction of value-added compounds from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces by natural deep eutectic solvents. *Food Research International*, 137, 109646.
- [106] Alrugaibah, M., Yagiz, Y., & Gu, L. (2021). Use natural deep eutectic solvents as efficient green reagents to extract procyanidins and anthocyanins from cranberry pomace and predictive modeling by RSM and artificial neural networking. *Separation and Purification Technology*, 255, 117720.
- [107] Prakash, S., Goswami, A., Patil, R., Mitra, A., & Kutty, N. N. (2024). An eco-friendly approach to extract anthocyanins from rose flowers using natural deep eutectic solvents. *Industrial Crops and Products*, 210, 118059.
- [108] Meng, X., Nalatambi, S., Mahaindran, A., Tee, L. H., Chua, B. L., Oh, K. S., & Lam, W. H. (2023). Characterization of choline chloride-based deep eutectic solvent for anthocyanin extraction via aqueous two-phase system: Physicochemical properties and liquid–liquid equilibrium phase diagram. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 18(6), e2990.
- [109] Zannou, O., & Koca, I. (2022). Greener extraction of anthocyanins and antioxidant activity from blackberry (*Rubus* spp) using natural deep eutectic solvents. *Lwt*, 158, 113184.

[110] Dai, Y., Rozema, E., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2016). Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. *Journal of Chromatography A*, 1434, 50-56.

[111] Borrás-Linares, I., Fernández-Arroyo, S., Arráez-Roman, D., Palmeros-Suárez, P. A., del Val-Díaz, R., Andrade-González, I., Fernández-Gutiérrez, A., Gómez-Leyva, J. F., & Segura-Carretero, A. (2015). Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Industrial Crops and Products*, 69, 385–394. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.053>

[112] Escobar-Ortiz, A., Castaño-Tostado, E., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., & Reynoso-Camacho, R. (2021). Anthocyanins extraction from *Hibiscus sabdariffa* and identification of phenolic compounds associated with their stability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(1), 110–119. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10620>

[113] Rodríguez-Medina, I. C., Beltrán-Debón, R., Molina, V. M., Alonso-Villaverde, C., Joven, J., Menéndez, J. A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2009). Direct characterization of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* using HPLC with diode array detection coupled to ESI and ion trap MS. *Journal of Separation Science*, 32(20), 3441–3448. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900298>

[114] Vargas, M. E. C., Shimizu-Marin, V. D., Nishiyama-Hortense, Y. P., Pérez-Navarro, J., Gómez-Alonso, S., Da Silva, R., & Lago-Vanzela, E. S. (2026). Dehydrated *Hibiscus sabdariffa* calyces as anthocyanin-rich natural colorants: Influence of food-grade extraction and syrup formulation on stability and technological performance. *Foods*, 15(4), 778. <https://doi.org/10.3390/foods15040778>

[115] Vidot, K., Achir, N., Mertz, C., Sinela, A., Rawat, N., Prades, A., Dangles, O., Fulcrand, H., & Dornier, M. (2016). Effect of temperature on acidity and hydration equilibrium constants of delphinidin-3-O- and cyanidin-3-O-sambubioside calculated from uni- and multiwavelength spectroscopic data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(20), 4139–4145. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00701>

[116] Salem, M. A., Zayed, A., Beshay, M. E., Abdel Mesih, M. M., Ben Khayal, R. F., George, F. A., & Ezzat, S. M. (2021). Hibiscus sabdariffa L.: Phytoconstituents, nutritive, and pharmacological applications. *Advances in Traditional Medicine*, 22, 497–507. <https://doi.org/10.1007/s13596-020-00482-2>

[117] Borrás-Linares, I., Herranz-López, M., Barrajon-Catalán, E., Arráez-Román, D., González-Álvarez, I., Bermejo, M., Fernández-Gutiérrez, A., Micol, V., & Segura-Carretero, A. (2015b). Permeability study of polyphenols derived from a phenolic-enriched Hibiscus sabdariffa extract by UHPLC-ESI-UHR-Qq-TOF-MS. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 18396–18411. <https://doi.org/10.3390/ijms160818396>

[118] Ali, M. A., Kaium, M. A., Uddin, S. N., Uddin, M. J., Olawuyi, O., Campbell, A. D., Saint-Louis, C. J., & Halim, M. A. (2023). Elucidating the structure, dynamics, and interaction of a choline chloride and citric acid based eutectic system by spectroscopic and molecular modeling investigations. *ACS Omega*, 8(40), 37137–37151. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c04570>

[119] Kurtulbaş, E., Pekel, A. G., & Bilgin, M. (2022). Citric acid-based deep eutectic solvent for the anthocyanin recovery from Hibiscus sabdariffa through microwave-assisted extraction. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 12(2), 351–360. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00606-3>

[120] Du, C. T., & Francis, F. J. (1973). Anthocyanins of roselle (Hibiscus sabdariffa, L.). *Journal of Food Science*, 38(5), 810–812. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1973.tb02081.x>

[121] Giribabu, D., Kumari, A., & Singh, S. (2025). Deep-eutectic solvent assisted extraction of Hibiscus sabdariffa anthocyanin for the synthesis of polyvinyl alcohol/carboxymethyl cellulose composite smart films. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.104030>

[122] Pires, M. A., et al. (2024). Natural deep eutectic solvents for anthocyanin extraction from agricultural sources: Process parameters, economic and environmental analysis, and industrial challenges. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 23(6), e70057. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.70057>

[123] Martins, K. P., Brito, N. L. H., Costa, G. B., Ramos, J. S., Alessi, A. C. S. B., Santos, T. A., ... Cardoso, F. A. R. (2025). 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. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5c11656>

[124] Đorđević SM, Santrić LR, Barać MS. Hydroxypropyl methylcellulose bioadhesive hydrogels for topical application and sustained drug release: the effect of polyvinylpyrrolidone on the physicochemical properties of hydrogel. *Pharmaceutics*. 2023;15(9):2347. doi:10.3390/pharmaceutics15092347

[125] Escribano-Ferrer E, García-Sala X, Escribano-Ferrer A. Effect of propylene glycol on the skin penetration of drugs. *Arch Dermatol Res*. 2020;312(5):337–347. doi:10.1007/s00403-019-02017-5

[126] Heikkinen AT, Lennernäs H, Rostami-Hodjegan A. Mechanisms of the drug penetration enhancer propylene glycol interacting with skin lipid membranes. *J Phys Chem B*. 2024;128(16):3885–3897. doi:10.1021/acs.jpcc.3c06784

[127] Morales-Castro J, Rios-Casanova L, Aguilera-Ortiz M, Solano-Cornejo MA. Extracting phenolic compounds from *Hibiscus sabdariffa* L. calyx using microwave assisted extraction. *Ind Crops Prod*. 2019;139:111490. doi:10.1016/j.indcrop.2019.111490

[128] Baymiev AK, Chuvatkina AK, Vladimirova AA, Matniyazov RT, Mavzyutov AR, Baymiev AK. Hydrogel delivery systems for biological active substances: properties and the role of HPMC as a carrier. *Molecules*. 2025;30(6):1354. doi:10.3390/molecules30061354

[129] Calixto GMF, Yoshii AC, Victorelli FD, Fonseca-Santos B, Chorilli M. Recent advances in hydrogels as strategy for drug delivery intended to vaginal infections. *Int J Pharm*. 2020;589:119867. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119867

[130] Martinović M, Nešić I, Tadić VM, Žugić A, Tasić-Kostov M, Blagojević S, et al. Skin performance of innovative NaDES-based gels: in vivo evaluation of anti-irritation potential and short-term efficacy. *Gels*. 2025;11(11):869. doi:10.3390/gels11110869

[131] Ozon, E. A., Burloiu, A. M., Musuc, A. M., Manda, G., Anuta, V., Dinu-Pîrvu, C. E., Lupuliasa, D., Neagoe, I. V., Anastasescu, M., Socoteanu, R. P., Atkinson, I., Mitran, R. A., Culita, D. C., & Boscencu, R. (2025). Cellulose-derived gels for topical delivery: HPMC as a functional matrix for porphyrinic photosensitizers. *Gels*, 11(10), 824. <https://doi.org/10.3390/gels11100824>

[132] Akhtar, M. J., Jacquot, M., & Desobry, S. (2014). Effect of HPMC–anthocyanin packaging color and oxygen permeability on salmon oil preservation. *Food and Bioprocess Technology*, 7(1), 93–104. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1075-y>

[133] Sazali, A. L., AlMasoud, N., Amran, S. K., Alomar, T. S., Pa'ee, K. F., El-Bahy, Z. M., Yong, T. L. K., Dailin, D. J., & Chuah, L. F. (2023). Physicochemical and thermal characteristics of choline chloride-based deep eutectic solvents. *Chemosphere*, 338, 139485. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139485>

[134] Ahmed, S., Bojilov, D., Exner, G., Dagnon, S., Manolov, S., & Ivanov, I. (2026). Solvatochromic polarity, physicochemical properties, and spectral analysis of new triple NADES-based on urea–glycerol. *Molecules*, 31(2), 233. <https://doi.org/10.3390/molecules31020233>

[135] Meng, X., Nalatambi, S., Mahaindran, A., Tee, L. H., Chua, B. L., Oh, K. S., & Lam, W. H. (2023). Characterization of choline chloride-based deep eutectic solvent for anthocyanin extraction via aqueous two-phase system: Physicochemical properties and liquid–liquid equilibrium phase diagram. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 18(6), e2990. <https://doi.org/10.1002/apj.2990>

[136] Verger, A., Kichou, H., Huang, N., Perse, X., Ardeza, I.-M., Pradel, C., Gonçalves Martins Da Conceição, R., Atanasova, B., Legrand, F.-X., Despres, A., Boudesocque-Delaye, L., & Munnier, E. (2024). Effects of hydrophilic natural deep eutectic solvents on the rheological, textural, and sensory properties of carboxymethylcellulose-based cosmetic hydrogels. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 12(18), 7187–7199. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.4c01866>

[137] Ghadermazi, R.; Hamdipour, S.; Sadeghi, K.; Ghadermazi, R.; Khosrowshahi Asl, A. Effect of various additives on the properties of the films and

coatings derived from hydroxypropyl methylcellulose — a review. *Food Science & Nutrition*, v. 7, n. 11, p. 3363-3377, 2019

[138] Pan, P., Svirskis, D., Waterhouse, G. I., & Wu, Z. (2023). Hydroxypropyl methylcellulose bioadhesive hydrogels for topical application and sustained drug release: the effect of polyvinylpyrrolidone on the physicochemical properties of hydrogel. *Pharmaceutics*, 15(9), 2360.

[139] Galvis-Sanchez, A. C., Castro, M. C. R., Biernacki, K., Goncalves, M. P., & Souza, H. K. (2018). Natural deep eutectic solvents as green plasticizers for chitosan thermoplastic production with controlled/desired mechanical and barrier properties. *Food Hydrocolloids*, 82, 478-489.

[140] Athanasopoulou, E., Maurizzi, E., Bigi, F., Quartieri, A., Pulvirenti, A., & Tsironi, T. (2025). Comparative effect of different plasticizers on physicochemical properties of hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC)-based films appropriate for gilthead seabream packaging. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 10, 100839.

[141] Paudel, S., Regmi, S., & Janaswamy, S. (2023). Effect of glycerol and sorbitol on cellulose-based biodegradable films. *Food Packaging and Shelf Life*, 37, 101090.

[142] Nguyen, H. V. D., De Vries, R., & Stoyanov, S. D. (2020). Natural deep eutectics as a “green” cellulose cosolvent. *ACS sustainable chemistry & engineering*, 8(37), 14166-14178.

[143] Filip, D., Macocinschi, D., Balan-Porcarasu, M., Varganici, C. D., Dumitriu, R. P., Peptanariu, D., ... & Zaltariov, M. F. (2022). Biocompatible self-assembled hydrogen-bonded gels based on natural deep eutectic solvents and hydroxypropyl cellulose with strong antimicrobial activity. *Gels*, 8(10), 666.

Material suplementar

As tabelas suplementares a seguir apresentam os dados estatísticos utilizados para sustentar a interpretação apresentada no texto principal. Foram avaliados dados de estatística descritiva, testes de normalidade, testes de homogeneidade de variâncias, testes globais e comparações múltiplas.

Tabela S1: Resumo geral da estratégia estatística por ensaio

Ensaio	Perfil dos dados	Teste principal	Estatística/p	Pós-teste
DPPH	Não paramétrico	Kruskal-Wallis	H = 18,09; p = 0,0116	Dunn-Bonferroni
FRAP	Paramétrico	ANOVA de um fator	F = 470,50; p < 0,001	Tukey HSD
Antocianinas totais	Paramétrico	ANOVA de um fator	F = 13.881,24; p < 0,001	Tukey HSD
Fenóis totais	Não paramétrico	Kruskal-Wallis	H = 13,87; p = 0,0165	Dunn-Bonferroni

S2. DPPH

Tabela S2: Estatística descritiva do ensaio DPPH

Amostra	Média	Desvio-padrão	n
LAT:XYL (1)	1254,25	137,57	3
ChCl:GLY (2)	1330,08	191,07	3
LAT:GLY (3)	1518,42	21,55	3
LAT:CIT (4)	1492,58	16,27	3
ChCl:XYL (5)	1528,42	11,55	3
LAT:GLU (6)	1504,25	82,88	3
LAT:GLY:CIT (7)	1553,42	7,64	3
Etanol 70% (8)	367,17	3,43	3

Tabela S3: Teste de Shapiro-Wilk para o ensaio DPPH

Amostra	W	p-valor	Normal?
LAT:XYL (1)	0,9990	0,9399	Sim
ChCl:GLY (2)	0,9888	0,7976	Sim
LAT:GLY (3)	0,9720	0,6788	Sim
LAT:CIT (4)	0,9980	0,9152	Sim
ChCl:XYL (5)	0,7500	< 0,001	Não
LAT:GLU (6)	0,8465	0,2310	Sim
LAT:GLY:CIT (7)	0,9643	0,6369	Sim
Etanol 70% (8)	0,9836	0,7549	Sim

Tabela S4: Teste global de Kruskal-Wallis para o ensaio DPPH

Teste	Estatística	p-valor	Conclusão
Kruskal-Wallis	H = 18,0905	0,0116	Diferença global significativa entre as amostras

Tabela S5: Comparação significativa no pós-teste de Dunn com correção de Bonferroni para DPPH

Comparação	p-valor ajustado (Bonferroni)
Etanol 70% (8) vs LAT:GLY:CIT (7)	0,0131

Somente o par apresentado manteve significância após a correção de Bonferroni.

S3. FRAP

Tabela S6: Estatística descritiva do ensaio FRAP

Amostra	Média	Desvio-padrão	n
LAT:XYL (1)	629,29	8,04	3
ChCl:GLY (2)	1495,95	21,26	3
LAT:GLY (3)	1466,37	16,25	3
LAT:CIT (4)	686,79	13,25	3
ChCl:XYL (5)	1464,70	41,10	3
LAT:GLU (6)	1435,95	30,68	3
LAT:GLY:CIT (7)	824,70	82,82	3
Etanol 70% (8)	431,57	3,34	3

Tabela S7: Teste de Shapiro-Wilk para o ensaio FRAP

Amostra	W	p-valor	Normal?
LAT:XYL (1)	0,8709	0,2982	Sim
ChCl:GLY (2)	0,8848	0,3386	Sim
LAT:GLY (3)	0,7825	0,0735	Sim
LAT:CIT (4)	0,9815	0,7391	Sim
ChCl:XYL (5)	0,8887	0,3504	Sim
LAT:GLU (6)	0,9965	0,8876	Sim
LAT:GLY:CIT (7)	0,8064	0,1298	Sim
Etanol 70% (8)	0,9668	0,6499	Sim

Tabela S8: Testes de Levene e ANOVA para o ensaio FRAP

Teste	Estatística	p-valor	Conclusão
Levene	L = 0,7200	p = 0,6572	Variâncias homogêneas
ANOVA	F = 470,4994	p < 0,001	Diferença global altamente significativa

Tabela S9: Comparações significativas no teste de Tukey HSD para o ensaio FRAP

Comparação	p
LAT:XYL (1) vs ChCl:GLY (2)	< 0,001
LAT:XYL (1) vs LAT:GLY (3)	< 0,001
LAT:XYL (1) vs ChCl:XYL (5)	< 0,001
LAT:XYL (1) vs LAT:GLU (6)	< 0,001
LAT:XYL (1) vs LAT:GLY:CIT (7)	0,0001
LAT:XYL (1) vs Etanol 70% (8)	0,0001
ChCl:GLY (2) vs LAT:CIT (4)	< 0,001
ChCl:GLY (2) vs LAT:GLY:CIT (7)	< 0,001
ChCl:GLY (2) vs Etanol 70% (8)	< 0,001
LAT:GLY (3) vs LAT:CIT (4)	< 0,001

Comparação	p
LAT:GLY (3) vs LAT:GLY:CIT (7)	< 0,001
LAT:GLY (3) vs Etanol 70% (8)	< 0,001
LAT:CIT (4) vs ChCl:XYL (5)	< 0,001
LAT:CIT (4) vs LAT:GLU (6)	< 0,001
LAT:CIT (4) vs LAT:GLY:CIT (7)	0,0048
LAT:CIT (4) vs Etanol 70% (8)	< 0,001
ChCl:XYL (5) vs LAT:GLY:CIT (7)	< 0,001
ChCl:XYL (5) vs Etanol 70% (8)	< 0,001
LAT:GLU (6) vs LAT:GLY:CIT (7)	< 0,001
LAT:GLU (6) vs Etanol 70% (8)	< 0,001
LAT:GLY:CIT (7) vs Etanol 70% (8)	< 0,001

Tabela S10: Agrupamento por letras pelo teste de Tukey HSD para FRAP

Amostra	Média (µM Fe(II)/mL)	Grupo de Tukey
ChCl:GLY (2)	1495,95	a
LAT:GLY (3)	1466,37	a
ChCl:XYL (5)	1464,70	a
LAT:GLU (6)	1435,95	a
LAT:GLY:CIT (7)	824,70	b
LAT:CIT (4)	686,79	c
LAT:XYL (1)	629,29	c
Etanol 70% (8)	431,57	d

S4. Antocianinas totais

Tabela S11: Estatística descritiva para antocianinas totais

Amostra	Média	Desvio-padrão	n
LAT:XYL (1)	3,22	0,03	3
ChCl:GLY (2)	7,58	0,02	3
LAT:GLY (3)	8,31	0,02	3
LAT:CIT (4)	7,73	0,02	3
ChCl:XYL (5)	5,02	0,02	3
LAT:GLU (6)	5,67	0,02	3
LAT:GLY:CIT (7)	10,63	0,02	3
Etanol 70% (8)	5,86	0,08	3

Tabela S12: Testes de pressupostos e ANOVA para antocianinas totais

Teste	Amostras	Resultado	Conclusão
Shapiro-Wilk	Todas as amostras	$p > 0,05$; $W \geq 0,9231$	Distribuição compatível com normalidade
Levene	Todas as amostras	$L = 1,0923$; $p = 0,4130$	Variâncias homogêneas
ANOVA	Todas as amostras	$F = 13.881,24$; $p < 0,001$	Diferença global altamente significativa

Tabela S13: Agrupamento por letras pelo teste de Tukey HSD para antocianinas totais

Amostra	Média (mg ACN/mL)	Grupo de Tukey
LAT:GLY:CIT (7)	10,63	a
LAT:GLY (3)	8,31	b
LAT:CIT (4)	7,73	c
ChCl:GLY (2)	7,58	d
Etanol 70% (8)	5,86	e
LAT:GLU (6)	5,67	f
ChCl:XYL (5)	5,02	g
LAT:XYL (1)	3,22	h

Todos os 28 pares possíveis apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) no teste de Tukey HSD.

S5. Fenóis totais

Tabela S14: Estatística descritiva para fenóis totais

Amostra	Média	Desvio-padrão	n
LAT:XYL (1)	568,85	57,75	3
LAT:GLY (3)	131,95	57,75	3
LAT:CIT (4)	17,93	1,03	3
LAT:GLU (6)	194,48	1,03	3
LAT:GLY:CIT (7)	127,24	1,03	3
Etanol 70% (8)	130,82	2,51	3

As amostras ChCl:GLY (2) e ChCl:XYL (5) não estavam presentes na tabela de fenóis totais do material estatístico analisado.

Tabela S15: Teste de Shapiro-Wilk para fenóis totais

Amostra	W	p-valor	Normal?
LAT:XYL (1)	0,7703	0,0455	Não
LAT:GLY (3)	0,7654	0,0342	Não
LAT:CIT (4)	1,0000	0,9947	Sim
LAT:GLU (6)	1,0000	0,9947	Sim
LAT:GLY:CIT (7)	1,0000	0,9947	Sim
Etanol 70% (8)	0,9861	0,7746	Sim

Tabela S16: Teste global de Kruskal-Wallis para fenóis totais

Teste	Estatística	p-valor	Conclusão
Kruskal-Wallis	H = 13,8655	0,0165	Diferença global significativa entre as amostras

Tabela S17: Comparação significativa no pós-teste de Dunn com correção de Bonferroni para fenóis totais

Comparação	p-valor ajustado (Bonferroni)
LAT:CIT (4) vs LAT:XYL (1)	0,0087

Somente o par apresentado manteve significância após a correção de Bonferroni.



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A3D1EA4

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A3D1EA4**
Usuário: **Universidade Federal do Amazonas**
CPF/CNPJ: **04.378.626/0001-97**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Mammea americana
Solanum sessiliflorum
Cassia leiandra
Bixa orellana
Genipa americana
Paullinia cupana
Hibiscus sabdariffa

Título da Atividade: **Identificação e Quantificação de Compostos Bioativos**

Equipe

Edgar Aparecido Sanches	Universidade Federal do Amazonas
Célio Matias Airone Macalia	Universidade Federal do Amazonas
Denilson Magalhaes Nogueira	Universidade Federal do Amazonas

Isabelle Valente de Oliveira
Kalil Araújo da Silva
Adriano de Souza Carolino
Jaqueline de Araújo Bezerra
Alessandra Ramos Lima
Josiana Moreira Mar

Universidade Federal do Amazonas
Universidade Federal do Amazonas
Universidade Federal do Amazonas
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia
Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP)
Universidade Federal do Amazonas

Parceiras Nacionais

10.792.928/0005-33 / Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas
63.025.530/0030-49 / Instituto de Física de São Carlos

Data do Cadastro: **15/06/2026 14:17:44**
Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **14:20** de **15/06/2026**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**