



**PPGAN**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - UNIRIO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO - PPGAN

**Gabriela Soares Macello Ramos**

**Solventes verdes na análise espectrofotométrica e lipofilização enzimática de  
compostos fenólicos**

RIO DE JANEIRO

2025

Gabriela Soares Macello Ramos

**Solventes verdes na análise espectrofotométrica e lipofilização enzimática de compostos fenólicos**

Dissertação de Mestrado a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Gabriela Bello Koblitz

RIO DE JANEIRO  
2025

Catálogo informatizada pelo(a) autor(a)

R165 Ramos, Gabriela Soares Macello  
Solventes verdes na análise espectrofotométrica e lipofilização enzimática de compostos fenólicos / Gabriela Soares Macello Ramos. -- Rio de Janeiro : UNIRIO, 2025. 168f

Orientadora: Maria Gabriela Bello Koblitz.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, 2025.

1. solventes eutéticos profundos naturais. 2. lipofilização enzimática. 3. compostos fenólicos. I. Koblitz, Maria Gabriela Bello , orient. II. Título.


Gabriela Soares Macello Ramos

**Solventes verdes na análise espectrofotométrica e lipofilização enzimática de compostos fenólicos**

Dissertação de Mestrado a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Aprovada em 11/07/2025

**BANCA EXAMINADORA**

Documento assinado digitalmente  
 **MARIA GABRIELA BELLO KOBLITZ**  
Data: 23/07/2025 17:28:29-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Profa. Dra. Maria Gabriela Bello Koblitz

**Presidente e Orientadora**

Assinado por: **ALEXANDRE BABO DE ALMEIDA PAIVA**  
Num. de Identificação: 11229452  
Data: 2025.07.24 10:05:11+01'00'

Prof. Dr. Alexandre Paiva

**Membro Externo ao PPGAN**

Documento assinado digitalmente  
 **MILLENA CRISTINA BARROS SANTOS**  
Data: 24/07/2025 11:24:55-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Millena Cristina Barros Santos

**Membro Externo ao PPGAN**

RIO DE JANEIRO

2025

Dedico esta dissertação aos meus pais por todo apoio e  
companheirismo durante toda a minha trajetória acadêmica.

## **Agradecimentos**

A realização desta dissertação foi possível graças ao apoio, incentivo e colaboração de muitas pessoas, às quais sou profundamente grata. Agradeço aos meus pais, Elayne Macello e Jorge Macello, por serem minha fortaleza e motivação. Agradeço por sempre segurarem minha mão e nunca me deixarem desistir diante das dificuldades. Agradeço por todo o apoio incondicional e pelas palavras de incentivo. Acima de tudo, agradeço por todo o amor.

Agradeço à minha orientadora Maria Gabriela Koblitz pela orientação dedicada, paciência, carinho, conselhos, oportunidades, disponibilidade e por compartilhar seu vasto conhecimento de forma generosa durante todas as etapas deste trabalho. Sua confiança no meu potencial foi essencial para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Aproveito para agradecer de antemão à banca examinadora, a qual participou da qualificação deste trabalho e agora presentes para a defesa de dissertação, pelas valiosas contribuições, sugestões e críticas construtivas que enriqueceram esta pesquisa.

Agradeço as minhas grandes amigas que tive a honra de conhecer na equipe do laboratório de Biotecnologia, Fernanda Sousa e Roberta Nogueira, pela ajuda nas análises, pelo apoio emocional e paciência, pelas discussões e aprendizados e pelos momentos de companheirismo, que tornaram essa jornada mais leve e produtiva. Agradeço ao técnico dos laboratórios, Matheus Grilo, pelas análises, paciência e aprendizado compartilhado.

Aos meus familiares, meus tios maternos, meu primo Iago e sua esposa Zarah, e a todos os meus amigos que sempre me ouviram nos momentos difíceis e não me deixaram desistir, em especial a Dra. Tássia Barboza, pelas conversas, conselhos e toda terapia alternativa e acupuntura que muito me ajudou a acalmar e relaxar nesse final.

Agradeço ao Prof. Dr. Renato Bigansolli pelas análises de FTIR Central Analítica Multiusuário da UFRRJ (CAM-UFRRJ). Agradeço à Caramuru pela doação do farelo de girassol. Agradeço à Novozymes Brasil pela doação das enzimas.

Agradeço à CAPES, à FAPERJ e ao CNPq, pelo apoio financeiro, que foi fundamental para a execução deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento e para a realização deste trabalho.

**“Determinação, coragem e autoconfiança  
são fatores decisivos para o sucesso”.**

**Dalai Lama**

## Resumo Geral

O presente trabalho investigou a quantificação e, posteriormente, a modificação de compostos fenólicos, com foco no ácido clorogênico (CGA), utilizando solventes eutéticos profundos naturais (NaDES). A dissertação foi estruturada em capítulos, incluindo revisões bibliográficas, avaliação de métodos analíticos e estudo de lipofilização enzimática. Inicialmente, avaliou-se a precisão de três métodos espectrofotométricos (Folin-Ciocalteu, Azul da Prússia e Fast Blue BB) para a quantificação de compostos fenólicos em NaDES, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) como método de referência. Foram testados quatro tipos diferentes de NaDES para extração de farelo de girassol. Os resultados demonstraram que o método Folin-Ciocalteu apresentou forte correlação ( $R > 0,99$ ) com o HPLC em NaDES à base de ácido láctico, enquanto o Fast Blue BB teve melhor desempenho em NaDES com glicerol. O Azul da Prússia mostrou-se o mais estável frente às diferentes formulações, embora com correlações menores. A quantificação por HPLC revelou que a maior concentração de CGA foi extraída com ácido láctico e glicose ( $3075,78 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e a menor com cloreto de colina e glicerol ( $579,14 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Na etapa seguinte, foi realizada uma revisão bibliográfica sobre lipofilização enzimática de compostos fenólicos em NaDES, abordando o potencial desses solventes como meio reacional alternativo e sustentável. Em seguida, conduziu-se um estudo da esterificação de CGA e ácido cafeico (CAF) com oleato de etila, utilizando as lipases comerciais Lipozyme 435 (N435) e Lipozyme RM como catalisadores. As reações foram realizadas nos sistemas ChCl:Gly (30% de água) e U:Gly 30%. Os resultados mostraram que, em ChCl:Gly 30%, a enzima N435 promoveu uma conversão de aproximadamente 32% do CGA após 24 horas, enquanto a enzima RM obteve apenas 17% de conversão no mesmo período. No caso do CAF, a conversão foi limitada com 30% de água, mas aumentou significativamente com a redução do teor de água para 3%, atingindo uma queda de cerca de  $1400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  na concentração inicial, em apenas 4 horas. A formação de derivados lipofílicos foi confirmada por espectroscopia no infravermelho (FTIR), com detecção da banda característica de ligação éster em  $1709 \text{ cm}^{-1}$ , preservação da estrutura aromática e de cadeia carbônica. O estudo concluiu que a eficiência da lipofilização dependeu diretamente da estrutura do substrato, do teor de água do sistema e do tipo de enzima empregada. Os resultados evidenciaram o potencial dos NaDES como sistemas sustentáveis e eficazes tanto para a extração e análise quanto para a modificação de compostos fenólicos.

## Palavras-chave

Antioxidante, solventes eutéticos profundos naturais, lipase, ácido clorogênico, ácido cafeico.



## General Abstract

**Green solvents in spectrophotometric analysis and enzymatic lipophilization of phenolic compounds.** The present study investigated the quantification and subsequent modification of phenolic compounds, with a focus on chlorogenic acid (CGA), utilizing natural deep eutectic solvents (NaDES). The dissertation was structured into chapters, encompassing literature reviews, evaluation of analytical methods, and a study on enzymatic lipophilization. Initially, the accuracy of three spectrophotometric methods (Folin-Ciocalteu, Prussian Blue, and Fast Blue BB) for quantifying phenolic compounds in NaDES was assessed, employing high-performance liquid chromatography (HPLC) as the reference method. Four different types of NaDES were tested for the extraction of sunflower meal. The results demonstrated that the Folin-Ciocalteu method exhibited a strong correlation ( $R > 0.99$ ) with HPLC in lactic acid-based NaDES, while Fast Blue BB performed better in glycerol-based NaDES. Prussian Blue proved to be the most stable across different formulations, albeit with lower correlations. HPLC quantification revealed that the highest CGA concentration was extracted with lactic acid and glucose ( $3075.78 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and the lowest with choline chloride and glycerol ( $579.14 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Subsequently, a literature review was conducted on the enzymatic lipophilization of phenolic compounds in NaDES, addressing the potential of these solvents as alternative and sustainable reaction media. Following this, a study on the esterification of CGA and caffeic acid (CAF) with ethyl oleate was performed, utilizing the commercial lipases Lipozyme 435 (N435) and Lipozyme RM as catalysts. Reactions were carried out in ChCl:Gly (30% water) and U:Gly 30% systems. The results indicated that, in ChCl:Gly 30%, the N435 enzyme promoted approximately 32% CGA conversion after 24 hours, whereas the RM enzyme achieved only 17% conversion within the same period. For CAF, conversion was limited with 30% water but significantly increased with a reduction in water content to 3%, reaching a decrease of approximately  $1400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  in initial concentration in just 4 hours. The formation of lipophilic derivatives was confirmed by Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy, with the detection of a characteristic ester bond band at  $1709 \text{ cm}^{-1}$ , alongside the preservation of the aromatic and carbon chain structures. The study concluded that the efficiency of lipophilization was directly dependent on the substrate structure, system water content, and enzyme type employed. The findings highlighted the potential of NaDES as sustainable and effective systems for both the extraction and analysis, and the modification of phenolic compounds.

## Keywords

Antioxidant, natural deep eutectic solvents, lipase, chlorogenic acid, caffeic acid

## Lista de Figuras

**Figura 1 Cap 1** Etapas da oxidação de ácidos graxos.

**Figura 2 Cap 1** Estrutura química dos antioxidantes sintéticos BHT, BHA, TBHQ e PG.

**Figura 3 Cap 1** Estrutura básica de diferentes compostos fenólicos.

**Figura 4 Cap 1** Alguns dos HBA e HBD mais usados para preparação de DES.

**Figura 5 Cap 1** Esquema da formação de um solvente eutético profundo.

**Figura 6 Cap 1** Classificação dos DES quanto aos tipos de DES e exemplos.

**Figura 1 Cap 2** Curves and coefficients of determination obtained for chlorogenic acid in the different NaDES, in ethanol (40%), and in water by HPLC.

**Figura 2 Cap 2** Curves and coefficients of determination obtained for chlorogenic acid in the different NaDES, in ethanol (40%), and in water by the Folin-Ciocalteu assay. (A) 15 to 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (B) 100 to 800  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

**Figura 3 Cap 2** Curves and coefficients of determination obtained for chlorogenic acid in the different NaDES, in ethanol (40%), and in water by the Prussian blue assay. (A) 15 to 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (B) 100 to 800  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

**Figura 4 Cap 2** Curves and coefficients of determination obtained for chlorogenic acid in the different NaDES, in ethanol (40%), and in water by the Fast Blue BB assay. (A) 15 to 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (B) 100 to 800  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

**Figura 5 Cap 2** Graphs of Pearson's correlation between spectrophotometric quantification assays and HPLC.

**Figura 6 Cap 2** Quantification of total phenolic compounds in sunflower meal extracts by HPLC and different spectrophotometric assays.

**Figura 7 Cap 2** Antioxidant activity of sunflower meal extracts by different analytical assays. Results are presented in  $\mu\text{Mol Trolox.L}^{-1}$  extract.

**Figura 1 Cap 3** Estrutura química dos antioxidantes sintéticos BHT, BHA, TBHQ e PG.

**Figura 2 Cap 3** Tipos de reações utilizados na lipofilização de ácidos fenólicos.

**Figura 3 Cap 3** Frequência (%) de publicações anuais sobre lipofilização enzimática por lipases em DES.

**Figura 4 Cap 3** Frequência dos substratos utilizados.

**Figura 5 Cap 3** Frequência dos 3 principais substratos hidrofílicos por ano.

**Figura 6 Cap 3** Frequência dos principais substratos hidrofóbicos por ano.

**Figura 7 Cap 3** Frequência das Enzimas utilizadas nos trabalhos por ano.

**Figura 8 Cap 3** Frequência do uso de DES hidrofílicos e hidrofóbicos ao longo dos anos.

**Figura 1 Cap 4** Concentração (mg L<sup>-1</sup>) de CGA (ácido clorogênico) nos diferentes sistemas catalíticos estudados.

**Figura 2 Cap 4** Registro da filtração dos brancos para análise no HPLC.

**Figura 3 Cap 4** Cromatogramas comparando o DES ChCl:Gly e o DES U:Gly.

**Figura 4 Cap 4** Concentração (mg L<sup>-1</sup>) de CGA (ácido clorogênico na esquerda) e CAF (ácido cafeico na direita) nos diferentes sistemas catalíticos estudados.

**Figura 5 Cap 4** Concentração (mg L<sup>-1</sup>) de CGA (ácido clorogênico na esquerda) e CAF (ácido cafeico na direita) nos diferentes sistemas catalíticos estudados.

**Figura 6 Cap 4** Conversão (%) de CGA (ácido clorogênico, esquerda) e CAF (ácido cafeico, direita) nos diferentes sistemas catalíticos estudados. Sendo NaDES de cloreto de colina (ChCl) e glicerol (Gly) com teor de água de 30% ou 3%.

**Figura 7 Cap 4** Espectro de FTIR dos padrões de ácido clorogênico (A) e ácido cafeico (B) em metanol.

**Figura 8 Cap 4** FTIR do extrato em acetona da reação de lipofilização de oleato de etila com ácido clorogênico.

**Figura 9 Cap 4** FTIR do extrato em acetona da reação de lipofilização de oleato de etila com ácido cafeico.

## **Lista de Tabelas**

**Tabela 1 Cap 1** Exemplos de HBA e HBD em NaDES, TheDES e DES hidrofóbicos.

**Tabela 1 Cap 2** Solvents composition and characteristics.

**Tabela 2 Cap 2** Antioxidant activity ( $\mu\text{Mol trolox.L}^{-1}$  NaDES) of pure NaDES by different assays.

**Tabela 1 Cap 3** Melhores resultados obtidos pelos estudos compilados.

**Tabela 2 Cap 3** Uso de compostos fenólicos como substratos.

**Tabela 1 Cap 4** Composição e características dos NaDES.

## Sumário

Introdução Geral.....	1
Objetivo Geral.....	2
Objetivos Específicos.....	3
Apresentação dos Capítulos.....	3
Referências.....	4
Capítulo 1 Revisão de Literatura.....	6
Antioxidantes e suas aplicações.....	7
Compostos fenólicos.....	9
Ácidos clorogênicos.....	11
Lipofilização de Compostos Fenólicos.....	13
Lipofilização Enzimática.....	14
Solventes Eutéticos Profundos (DES).....	16
DES e lipases.....	23
Métodos de quantificação de compostos fenólicos.....	25
Referências.....	27
Capítulo 2 Evaluating spectrophotometric and antioxidant activity methods for phenolic compounds quantification in natural deep eutectic solvents.....	35
Abstract.....	36
Introduction.....	36
Materials and methods.....	38
Results.....	41
Discussion.....	49
Conclusion.....	55
References.....	56
Capítulo 3 Lipofilização Enzimática em Solventes Eutéticos Profundos – Uma Revisão	
Indicador não definido.	

<b>Resumo</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>Introdução</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>Metodologia</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>Esterificação e Transesterificação em DES</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>Discussão</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>Conclusão</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>Referências</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>Capítulo 4 Lipofilização enzimática de ácidos fenólicos em NaDES</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>Resumo</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>Introdução</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>Metodologia</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>Resultados e Discussão</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>Definição das condições de reação e análise</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>Reações de lipofilização</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>Avaliação da lipase e do NaDES</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>Avaliação do ácido fenólico e do tempo de reação</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>Avaliação do teor de água no meio reacional</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>Avaliação da formação do produto lipofilizado</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>Conclusão</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>Referências</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>Conclusão geral</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>Anexos</b> .....	Erro! Indicador não definido.

## Introdução Geral

Desde a década de 1940, a necessidade de conservar a integridade dos lipídios em alimentos industrializados gerou um imperativo pela utilização de aditivos que possam desacelerar o processo de oxidação [1]. A oxidação de moléculas é um processo natural que pode levar à formação de radicais livres, associados a diversos mecanismos de reação, cujo consumo ou ocorrência *in vivo* podem ser relacionados ao risco do desenvolvimento de várias doenças. Os antioxidantes, por sua vez, possuem a capacidade de inibir a oxidação de outras moléculas, eliminando diretamente os radicais livres ou auxiliando as defesas antioxidantes dos alimentos e dos organismos vivos. A eliminação dos radicais livres e o atenuamento da peroxidação lipídica, quando em concentração significativamente menor que a dos compostos que visam proteger, são atributos essenciais dos antioxidantes na manutenção da estabilidade de alimentos ricos em lipídios [2–4]. Os antioxidantes de origem sintética têm a capacidade de interagir de maneira a desempenhar um papel crucial na melhoria da estabilidade dos alimentos. Entretanto, vale ressaltar que um emprego inadequado ou excessivo de antioxidantes sintéticos pode resultar em riscos à saúde humana. Diante desse contexto, há um grande interesse na identificação de fontes alternativas naturais [1].

O mercado de antioxidantes na indústria alimentícia é um setor de considerável magnitude, avaliado em cerca de 1,63 bilhão de dólares em 2023, com uma projeção de expansão anual de 5,47% até 2030 [5]. A busca por uma vida mais saudável tem impulsionado o interesse por compostos antioxidantes naturais: moléculas não sintéticas capazes de desempenhar um papel fundamental na proteção dos alimentos, especialmente os lipídicos, contra danos oxidativos. Alternativas sustentáveis tem se destacado em várias indústrias, cujos coprodutos apresentam compostos que podem apresentar diversas bio- e quimio-atividades, substituindo componentes sintéticos em processos biotecnológicos. A conscientização dos consumidores sobre saúde e o meio ambiente vem impulsionando a demanda por aditivos naturais na geração de produtos *clean label*.

Compostos fenólicos, tais como o ácido clorogênico (CGA), têm atraído considerável interesse científico devido às suas propriedades antioxidantes e a sua ampla disponibilidade em matrizes vegetais. Uma abordagem promissora para a obtenção desses compostos é na utilização de coprodutos gerados durante a cadeia produtiva de alimentos, diminuindo a geração de resíduos e os custos de obtenção. Contudo, essas moléculas possuem características polares, o que resulta em sua baixa solubilidade em meios lipídicos, que são o destino principal de sua aplicação. Nesse sentido, uma estratégia prática para incorporar esses compostos às formulações lipídicas

é aumentar sua hidrofobicidade através de reações de lipofilização [6,7]. Lipofilização é a inserção de parte lipofílica - através reações esterificação ou transesterificação - a uma molécula hidrofílica, visando reduzir a sua polaridade e aumentar sua dispersão em matrizes apolares/lipídicas. Entretanto, a realização de tal reação apresenta diversas dificuldades relacionadas, sobretudo, à mistura de reagentes de características opostas (um polar e outro apolar) e à manutenção da atividade e da estabilidade da enzima aplicada como catalizador, tornando essencial a otimização do meio reacional [8,9], especialmente o solvente. Os solventes eutéticos profundos naturais (NaDES) são uma nova geração de solventes sustentáveis, que se caracterizam pela mistura de dois ou mais componentes, oriundos de fontes renováveis, compreendendo um doador e um acceptor de ligação de hidrogênio. As características intrínsecas dos NaDES fazem desses solventes meios ideais para a realização de esterificações mediadas por lipases [10,11].

Bezerra e colaboradores [12] revisaram o uso de NaDES na extração de compostos fenólicos. Quando comparados aos solventes orgânicos, os NaDES demonstraram um notável aumento da estabilidade dos compostos fenólicos extraídos, atribuída às interações de ligação de hidrogênio entre os elementos constituintes, e desempenharam papel fundamental, não apenas na maior solubilidade dos compostos, mas também na eficácia para sua extração. Apesar das suas vantagens, existem consideráveis desafios no que se refere à análise e quantificação destes compostos dissolvidos em NaDES.

O presente projeto visou contribuir para a redução da grande dificuldade para quantificação, por meios espectrofotométricos, de compostos fenólicos em meio de NaDES. Adicionalmente, a presente dissertação pretendeu responder às demandas do mercado de antioxidantes na indústria alimentícia de diversas formas: pela obtenção de compostos fenólicos a partir de resíduos da agroindústria, que estima-se produzir cerca de 190 milhões de toneladas de coprodutos por ano [13], reduzindo a geração de resíduos subutilizados; pela utilização de solventes 'verdes' na extração e como meio reacional para lipofilização de ácido clorogênico por tecnologia enzimática, visando a obtenção de aditivos seguros e 100% sustentáveis dentro dos princípios da economia circular [14].

## **Objetivo Geral**

O objetivo deste estudo foi comparar os métodos de quantificação de compostos fenólicos e estudar a lipofilização do ácido clorogênico por meio da esterificação catalisada por lipases, dentro de sistemas de solventes eutéticos profundos naturais (NaDES).



## Objetivos Específicos

- Avaliar três diferentes métodos espectrofotométricos de quantificação de compostos fenólicos;
- Estudar a esterificação enzimática entre o ácido clorogênico padrão e o oleato de etila em meio de NaDES previamente selecionado;

## Apresentação dos Capítulos

Para cumprir com os objetivos apresentados acima, esta dissertação de mestrado foi composta por quatro capítulos.

No capítulo 1, foi realizada uma revisão bibliográfica sobre o assunto geral da dissertação com o objetivo de introduzir os temas a serem abordados separadamente nos próximos capítulos.

O capítulo 2 apresenta um artigo científico original, publicado em novembro de 2024, na revista *Journal of Molecular Liquids* (FI = 5,3) (RAMOS et al., 2024). O artigo aborda um estudo comparativo de três diferentes métodos espectrofotométricos comumente utilizados para a quantificação de compostos fenólicos, utilizando HPLC como método de referência. Foi utilizado o ácido clorogênico (5-CGA) como padrão, e quatro formulações diferentes de NaDES como solventes, bem como uma solução hidroetanólica a 40%, como padrão para comparação. Além disso, extratos de farelo de girassol, ricos em CGA, também foram avaliados, com o objetivo final de destacar os vários obstáculos característicos dos métodos espectrofotométricos e contribuir para a compreensão dos desafios associados à quantificação de compostos fenólicos em NaDES.

O capítulo 3 apresenta uma revisão bibliográfica que será submetida, em forma de artigo de revisão, para a revista *Catalysis Letters* (FI = 2,5) sobre o tema de “lipofilização enzimática em solventes eutéticos profundos”. A revisão aborda o uso de lipases como biocatalisadores, visando melhorar a hidrofobicidade, a solubilidade e a estabilidade desses compostos em matrizes lipídicas. A metodologia consistiu em uma busca sistemática de estudos publicados entre 2012 e fevereiro de 2025, incluindo artigos experimentais e de revisão relacionados a este tema.

O capítulo 4 apresenta o estudo de lipofilização enzimática, que será submetido em forma de artigo científico original ao periódico *ACS Catalysis* (FI = 11,3). O artigo aborda a lipofilização enzimática (Lipozyme 435 e Lipozyme RM) de dois ácidos fenólicos (ácido clorogênico e ácido cafeico) com oleato de etila, catalisada por lipases em diferentes NaDES (ChCl:Gly e ChCl:U) em diferentes teores de água, 30% e 3%, visando melhorar a solubilidade e aplicabilidade dos compostos fenólicos em matrizes lipídicas.

## Referências

- [1] X. Xu, A. Liu, S. Hu, I. Ares, M.-R. Martínez-Larrañaga, X. Wang, M. Martínez, A. Anadón, M.-A. Martínez, Synthetic phenolic antioxidants: Metabolism, hazards and mechanism of action, *Food Chemistry* 353 (2021) 129488. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129488>.
- [2] J. Pokorný, Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants?, *Euro J Lipid Sci & Tech* 109 (2007) 629–642. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700064>.
- [3] M. Caroch, I.C.F.R. Ferreira, A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives, *Food and Chemical Toxicology* 51 (2013) 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>.
- [4] Í. Gulcin, Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview, *Arch Toxicol* 94 (2020) 651–715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>.
- [5] S. Gupta, Food Antioxidants Market Research Report Information By Type (Natural and Synthetic), By Source (Fruits & Vegetables, Nuts & Seeds, Oils & Petroleum, and Spices & Herbs), By Application (Fats & Oils, Processed Foods, Beverages, Bakery & Confectionery, Meat & Poultry, and Others), And By Region (North America, Europe, Asia-Pacific, And the Rest Of The World) – Market Forecast Till 2030., Market Research Future (2022). <https://www.marketresearchfuture.com/reports/food-antioxidants-market-4534> (accessed August 23, 2023).
- [6] B.R. Albuquerque, S.A. Heleno, M.B.P.P. Oliveira, L. Barros, I.C.F.R. Ferreira, Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges, *Food Funct.* 12 (2021) 14–29. <https://doi.org/10.1039/D0FO02324H>.
- [7] M.F. Ramadan, Pheno-phospholipids and Lipo-phenolics: Novel Structured Antioxidants, Springer International Publishing, Cham, 2021. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-67399-4>.
- [8] A. Fernández, M.A. Longo, F.J. Deive, M.S. Álvarez, A. Rodríguez, Dual role of a natural deep eutectic solvent as lipase extractant and transesterification enhancer, *Journal of Cleaner Production* 346 (2022) 131095. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131095>.
- [9] D. Arnodo, E. Maffei, F. Marra, S. Nejrotti, C. Prandi, Combination of Enzymes and Deep Eutectic Solvents as Powerful Toolbox for Organic Synthesis, *Molecules* 28 (2023) 516. <https://doi.org/10.3390/molecules28020516>.
- [10] F.M. Perna, P. Vitale, V. Capriati, Deep eutectic solvents and their applications as green solvents, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 21 (2020) 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.09.004>.
- [11] J.N. Al-Dawsari, A. Bessadok-Jemai, I. Wazeer, S. Mokraoui, M.A. AlMansour, M.K. Hadj-Kali, Fitting of experimental viscosity to temperature data for deep eutectic solvents, *Journal of Molecular Liquids* 310 (2020) 113127. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113127>.
- [12] F.D.S. Bezerra, D.F. Da Costa, M.G.B. Koblitz, Aproveitamento integral de matérias-primas oleaginosas com “solventes verdes”: revisão e oportunidades, *RSD* 9 (2020) e372985388. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i8.5388>.
- [13] R.N. Rațu, I.D. Veleșcu, F. Stoica, A. Usturoi, V.N. Arsenoia, I.C. Crivei, A.N. Postolache, F.D. Lipșa, F. Filipov, A.M. Florea, M.A. Chițea, I.S. Brumă, Application of Agri-Food By-Products in the Food Industry, *Agriculture* 13 (2023) 1559. <https://doi.org/10.3390/agriculture13081559>.
- [14] A. Mir-Cerdà, O. Nuñez, M. Granados, S. Sentellas, J. Saurina, An overview of the

extraction and characterization of bioactive phenolic compounds from agri-food waste within the framework of circular bioeconomy, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 161 (2023) 116994. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.116994>.

# **Capítulo 1**

## **Revisão de literatura**

## Revisão de literatura

### Antioxidantes e suas aplicações

A oxidação dos lipídios, especialmente ácidos graxos poli-insaturados, é um desafio crucial na preservação da qualidade dos alimentos devido à sua alta vulnerabilidade a reações oxidativas [1]. A autooxidação também conhecida como peroxidação é o mecanismo pelo qual radicais livres atacam ácidos graxos insaturados causando deterioração oxidativa. A estabilidade oxidativa dos lipídios depende de fatores intrínsecos, como a composição de ácidos graxos e o tipo de lipídio, e extrínsecos, como condições ambientais – temperatura, disponibilidade de oxigênio e exposição à radiação UV, entre outros [2].

O processo oxidativo é mediado por radicais livres em três etapas: iniciação, propagação e terminação [2] (Figura 1). Na iniciação, ocorre a ruptura de ligações carbono-hidrogênio próximas aos carbonos alílicos nos ácidos graxos gerando radicais livres; na propagação, esses radicais reagem com oxigênio, formando radicais de peróxido que são instáveis e se degradam gerando novos radicais livres, ampliando a oxidação; na terminação, os radicais livres reagem uns com os outros, gerando moléculas estáveis, geralmente oxigenadas e de baixa massa molecular [3]. Lipídios ricos em ácidos graxos insaturados apresentam menor estabilidade e estudos apontam que ácidos graxos livres são mais suscetíveis à oxidação do que triacilgliceróis (TAG) [2].

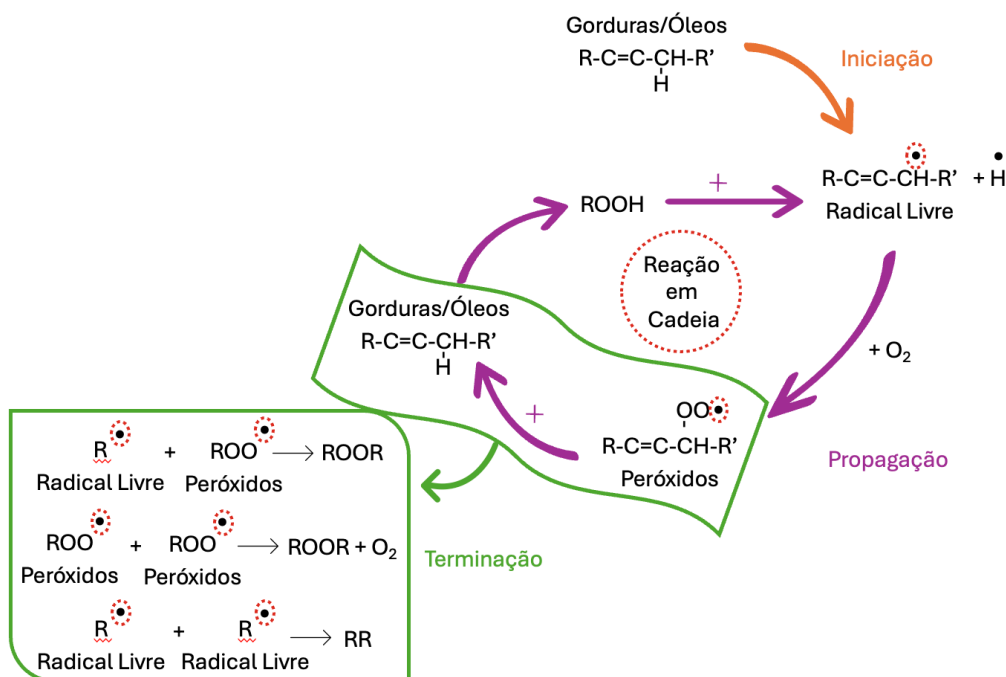


Figura 1. Etapas da oxidação de ácidos graxos.

A necessidade de preservar a estabilidade dos lipídios contra a oxidação nos alimentos já era reconhecida antes da Segunda Guerra Mundial, quando eram utilizados antioxidantes naturais, uma vez que os antioxidantes sintéticos ainda não estavam disponíveis no mercado [4]. Antioxidantes são moléculas essenciais que atuam, em concentrações significativamente inferiores às de um substrato oxidável, inibindo ou retardando processos de oxidação. Entre as principais formas de iniciação dos processos oxidativos encontram-se os radicais livres, espécies altamente instáveis e reativas [5], muitas vezes derivadas de elementos como oxigênio, nitrogênio e enxofre. Esses radicais, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS) e espécies reativas de enxofre (RSS), estão associados a danos celulares e ao desenvolvimento de diversas doenças. Portanto, um antioxidante pode ser definido como uma substância que elimina diretamente as RXS ou inibe sua produção e/ou propagação. Indiretamente antioxidantes podem ainda agir na regulação das defesas antioxidantes [6]. Os antioxidantes são essenciais para inibir a propagação de radicais livres lipídicos, prevenindo a degradação dos alimentos e prolongando sua vida útil [5]. Eles interrompem a cadeia de reações mediadas por radicais livres ao interagir com radicais em reações de terminação, o que reduz o processo oxidativo [3]. Os antioxidantes primários neutralizam radicais livres por meio da doação de átomos de hidrogênio (HAT) ou transferência de elétrons (SET), sendo altamente eficazes, em pequenas quantidades, para neutralizar um grande número de radicais livres. Os antioxidantes secundários agem neutralizando catalisadores pró-oxidantes, complementando a proteção contra a oxidação [5]. Os antioxidantes podem ser classificados como naturais ou sintéticos e podem fazer parte da composição das matérias-primas (naturais) ou serem intencionalmente adicionados (naturais e sintéticos) na formulação dos produtos com o objetivo de prevenir a oxidação lipídica. Sua atividade antioxidante depende basicamente de sua estrutura química e polaridade, garantindo a estabilidade durante o processamento e armazenamento de gorduras, óleos e alimentos ricos em lipídios [4,7].

Atualmente, na indústria alimentícia, os antioxidantes fenólicos sintéticos, como BHA (hidroxianisola butilado), BHT (hidroxitolueno butilado), galato de propila (PG) e terc-butil hidroquinona (TBHQ) [1] (Figura 2), são amplamente utilizados para estabilizar alimentos contra a oxidação. Entretanto, evidências recentes demonstraram que, apesar do BHA ser particularmente eficaz no controle da oxidação de ácidos graxos de cadeia curta, esse composto apresenta propriedades carcinogênicas em concentrações próximas aos níveis utilizados como aditivos alimentares. O BHT, devido à presença de dois grupos terc-butil, que resultam em maior impedimento estérico, não é tão eficaz quanto o BHA [6]. Nos últimos anos, tem crescido a demanda por antioxidantes

naturais, extraídos de fontes sustentáveis, com o objetivo de substituir os antioxidantes sintéticos, dada a preocupação com seus potenciais efeitos cancerígenos e tóxicos [2].

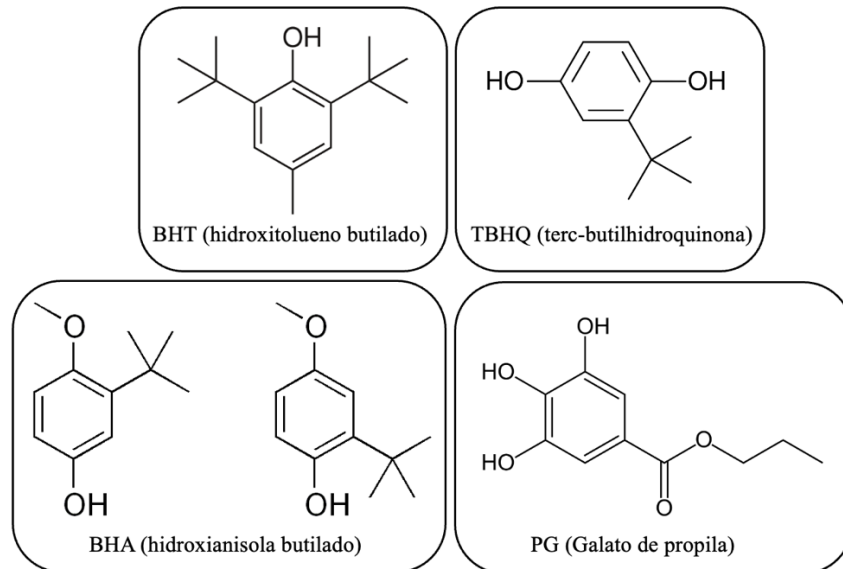


Figura 2. Estrutura química dos antioxidantes sintéticos BHT, BHA, TBHQ e PG

### **Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos são substâncias encontradas em várias fontes vegetais, como cereais, hortaliças, frutas, chás, ervas e entre outras. Sua estrutura consiste em um ou mais anéis aromáticos acoplados a um ou mais substituintes hidroxila, o que resulta em uma variedade de estruturas químicas (Figura 3). Esses compostos são os principais constituintes produzidos como parte do metabolismo secundário das plantas. Devido à diversidade de fontes naturais de compostos fenólicos, estes se apresentam em uma ampla gama de diferentes estruturas [8,9]. Compostos fenólicos são uma classe de moléculas bioativas amplamente investigadas pela comunidade científica, devido as suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antialérgicas, antimicrobianas, antitrombóticas, cardioprotetoras e vasodilatadoras [8,10]. Na ciência de alimentos, os polifenóis têm sido objeto de estudo, devido ao seu papel na prevenção do dano oxidativo [11]. São moléculas especialmente reconhecidas por suas propriedades antioxidantes, que estão associadas as suas propriedades redutoras, pois atuam como doadores de hidrogênio ou elétrons. Apresentam, assim, potencial como neutralizadores de radicais livres, capazes de retardar ou inibir a oxidação de lipídios proteínas e ácidos nucleicos [9,12].

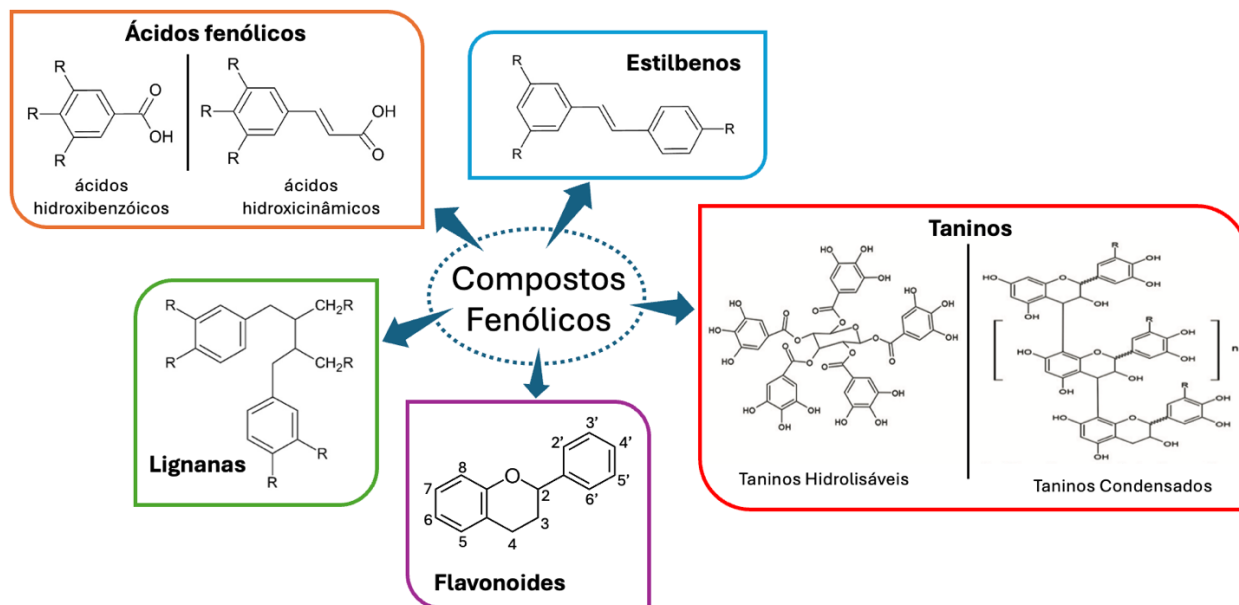


Figura 3. Estrutura básica de diferentes compostos fenólicos.

Os antioxidantes fenólicos são compostos biologicamente ativos amplamente encontrados em vegetais, caracterizados pela presença de um anel aromático com, pelo menos, um grupo hidroxila (-OH) [13]. Esses compostos atuam neutralizando espécies reativas de oxigênio por meio de mecanismos como a transferência de átomos de hidrogênio (HAT), transferência de elétron único (SET) e quelação de metais de transição (TMC). No HAT, os antioxidantes doam átomos de hidrogênio para estabilizar radicais livres, enquanto no SET transferem elétrons e no TMC formam complexos estáveis com íons metálicos, prevenindo reações oxidativas [5].

Os ácidos fenólicos compõem cerca de 30% dos compostos fenólicos presentes nas plantas, podendo ser ácidos hidroxibenzoicos ou hidroxicinâmicos, de acordo com suas características estruturais. Assim, se apresentam na forma de ésteres, glicosídeos e complexos insolúveis, ocorrendo tanto na forma livre, como o ácido cafeico (CAF), quanto na forma ligada, como o ácido clorogênico [6,14]. Sua estrutura química, especialmente a posição e o número de grupos -OH, é determinante para sua capacidade antioxidante, sendo que posições orto e para no anel benzênico aumentam a eficiência em comparação com a posição meta. Além disso, a separação do grupo carbonila, derivado do grupo carboxila (COOH), do anel aromático por grupos como CH<sub>2</sub>, aumenta a estabilidade do radical formado devido a efeitos de ressonância, melhorando o desempenho antioxidante. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos também é influenciada por fatores como a presença de grupos volumosos no anel aromático, que estabilizam radicais livres por impedimento estérico e reduzem a propagação de reações [5].

Os antioxidantes fenólicos são moléculas com características polares e, por isso, expressam suas propriedades funcionais em um ambiente hidrofílico, apresentando baixa solubilidade em



meios lipídicos. Além das características estruturais que afetam o potencial antioxidante, a eficiência é influenciada por suas propriedades físico-químicas, tais como a polarizabilidade e hidrofobicidade. Assim, uma abordagem prática para incorporar esses compostos em formulações lipídicas é aumentar sua hidrofobicidade pela lipofilização [15,16].

Uma abordagem de grande importância na obtenção de compostos fenólicos é a utilização de resíduos e coprodutos gerados durante a cadeia produtiva de alimentos que geralmente não possuem valor econômico. Essa abordagem visa reduzir o desperdício, uma vez que esses coprodutos representam uma porcentagem significativa nas indústrias de processamento de alimentos, aproveitando esses materiais na obtenção de compostos fenólicos valiosos a partir de fontes alternativas [9,17].

### **Ácidos clorogênicos**

Ácido clorogênico (CGA) é o nome coletivo dado a um grupo de ésteres formados pela condensação de ácido quínico e ácidos trans-cinâmicos, incluindo ácido cafeico (CAF), ácido p-cumárico (p-CoA) e ácido ferúlico (FA) [18,19]. São metabólitos secundários em plantas, produzidos pela via do ácido chiquímico [20]. Devido às ligações éster, ligações duplas insaturadas e estruturas de polifenóis instáveis presentes em sua estrutura molecular, o CGA é facilmente sujeito à isomerização por meio da migração de grupos ésteres intramoleculares [21]. Dentro de cada subgrupo, existem várias formas isoméricas de CGA, sendo o isômero mais abundante, em fontes alimentares e vegetais, o ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQA) [18]. O 5-CQA, também conhecido como CGA, é um dos compostos fenólicos mais biologicamente funcionais devido à sua estrutura molecular, que contém cinco grupos hidroxila ativos e um grupo carboxila. Geralmente, o 5-CQA tem baixa solubilidade em solventes orgânicos apolares, como clorofórmio, éter e benzeno, mas é prontamente solúvel em solventes orgânicos polares, como metanol, etanol e acetona [18,21]. O CGA é encontrado em abundância em diversas frutas, vegetais e especiarias, como chá, feijão verde, café, cacau, maçã, pera, morango, manga, mirtilo, semente de girassol, entre outros [18–21], e tem recebido crescente atenção devido às suas propriedades benéficas para a saúde, tais como ação anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana, antiobesidade, antitumoral, anti-hipertensiva, melhora de distúrbios metabólicos e efeitos protetores no trato gastrointestinal e no sistema nervoso [18,19].

O CGA apresenta dois usos distintos no campo da indústria alimentícia, podendo ser um aditivo nutricional, onde sua incorporação está relacionada ao seu poder antioxidante funcional, agindo contra o estresse oxidativo no organismo, ou um aditivo conservante, agindo contra o processo de oxidação lipídica em alimentos [22]. O desempenho antioxidante natural do CGA é

influenciado por sua estrutura molecular, em que os grupos hidroxila fenólicos reagem prontamente com os radicais livres, eliminando os radicais hidroxila e ânions superóxido [21].

### **Fontes de CGA**

O café está entre as bebidas mais consumidas em todo o mundo. Segundo Makiso e colaboradores [23], em uma recente e abrangente revisão sobre o café e seus compostos bioativos, o café é amplamente reconhecido como uma bebida rica em compostos bioativos que lhe conferem, entre outras propriedades, sua alta atividade antioxidante. As diferenças entre espécies de café plantadas comercialmente, especialmente *Coffea arabica* e *C. canephora*, influenciam sua composição química, porém independente da espécie ou variedade, o CGA é o principal polifenol do café. Este composto fenólico representa entre 12% e 18% da matéria seca do café verde e é capaz de exercer efeitos no metabolismo energético, inibindo o acúmulo de gordura, modulando a glicose e protegendo o DNA contra danos oxidativos, pela neutralização de radicais livres.

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma das principais oleaginosas do mundo, com produção global de aproximadamente 20 milhões de toneladas métricas [24] e gera, como coproduto da extração do óleo, o farelo de girassol, rico em proteínas (cerca de 32%) e compostos fenólicos, que podem alcançar até 4% da sua massa seca. O CGA é o composto fenólico predominante, representando cerca de 70% do total de polifenóis em sua semente, com atividade antibacteriana, antioxidantes e anticarcinogênica [17]. O girassol já foi apontado como importante fonte de desses compostos bioativos, com múltiplas aplicações [24]. De acordo com Bezerra e colaboradores [17], as oleaginosas estão entre as plantas de maior produção mundial, com importante produção de CGA. Além do girassol, a amêndoa apresenta cerca de 60% dos compostos fenólicos do fruto na pele, incluindo CGA, ácido sinápico e catequinas, assim como o amendoim, que tanto na semente crua quanto na torrada, contém ácidos fenólicos, inclusive os da família do CGA. Kahlaoui e colaboradores [25] realizaram a caracterização de compostos polifenólicos, incluindo o ácido clorogênico, extraídos de diferentes variedades de cascas de amêndoa (*Prunus dulcis* L.) utilizando a etanol/água como solvente. De forma semelhante, Labeiko e colaboradores [26] avaliaram a influência de diferentes parâmetros tecnológicos sobre a eficiência da extração de ácido clorogênico a partir da farinha de girassol. Náthia-Neves e Alonso [27] obtiveram ácido clorogênico a partir de subprodutos de girassol, empregando a técnica de extração assistida por micro-ondas (MAE). Ali e colaboradores [28] investigaram o uso do tratamento ultrassônico na extração de compostos fenólicos, destacando a identificação do ácido clorogênico em três diferentes tortas orgânicas de sementes de girassol submetidas à extração com hexano.

Diversos estudos têm demonstrado o potencial dos solventes eutéticos profundos (DES) na extração de ácido clorogênico de diferentes matrizes vegetais. Vieira e colaboradores [29] investigaram a extração de compostos fenólicos, identificando o ácido neoclorogênico, a partir de folhas de noqueira (*Juglans regia* L.), utilizando DES à base de cloreto de colina e ácidos carboxílicos. Wu e colaboradores [30] estudaram a extração e subsequente recuperação de ácido clorogênico de resíduos de girassol, empregando DES associados a resinas macroporosas. Bezerra e colaboradores [31] avaliaram como diferentes solventes eutéticos profundos naturais (NaDES) influenciam na extração, na atividade antioxidante e na estabilidade de ácido clorogênico a partir do farelo de girassol. Complementarmente, Ramos e colaboradores [32] realizaram um estudo comparativo entre diferentes métodos analíticos aplicados à quantificação de compostos fenólicos, utilizando extratos de ácido clorogênico em NaDES a partir do farelo de girassol, contribuindo para a padronização e a confiabilidade dos resultados obtidos nesses sistemas. Mais recentemente, Bezerra e colaboradores [33] propuseram uma estratégia de extração de ácido clorogênico utilizando NaDES, seguida de uma etapa de extração líquido-líquido com solventes orgânicos, visando a recuperação do composto-alvo, demonstrando uma abordagem promissora para a purificação de compostos bioativos extraídos com solventes alternativos.

### ***Lipofilização de Compostos Fenólicos***

A lipofilização é um processo que consiste na modificação de moléculas hidrofílicas (açúcares, aminoácidos, proteínas ou compostos fenólicos) por meio da introdução de uma porção lipídica em sua estrutura, conferindo-lhes características anfífilas e aumentando sua solubilidade em óleo, além de melhorar sua atividade superficial [15,34]. A lipofilização visa diminuir a polaridade da molécula hidrofílica, o que torna essas reações vantajosas, desde que mantenham as propriedades funcionais originais desses compostos [15,35]. Dessa forma, a lipofilização permite a obtenção de compostos fenólicos funcionalizados, conhecidos como fenolipídios, que apresentam propriedades aprimoradas em relação aos seus equivalentes hidrofílicos naturais [15,34,35]. A modificação é realizada por meio de esterificação de grupos hidroxila (-OH) ou carboxílicos (-COOH) de ácidos fenólicos com moléculas alifáticas, como ácidos graxos ou álcoois graxos [36]. A funcionalização de compostos fenólicos (síntese de fenolipídios) foi capaz de amplificar a capacidade antioxidante em relação aos polifenóis originais, mostrando melhorar as propriedades antioxidantes do composto original e se apresentarem mais estáveis e biodisponíveis devido à sua lipofilia [35]. Estudos indicaram que tanto o comprimento da cadeia alquila quanto o tipo de núcleo polifenólico modificado desempenham papel crucial nesses compostos,

influenciando significativamente o desempenho antioxidante e na interrupção de processos oxidativos, respectivamente [35,36].

A lipofilização pode ser alcançada por reações de esterificação (reação entre um ácido e um álcool), transesterificação (reação entre um éster e um álcool) ou interesterificação (reação entre dois ésteres) através de diferentes vias catalíticas: catálise química (ácida ou básica) ou biocatálise (enzimática) [13]. A síntese química ocorre sob condições drásticas de temperatura e pH, o que pode levar à degradação de compostos sensíveis, à formação de produtos secundários indesejados e à necessidade de várias etapas de purificação, tornando o processo longo, caro e menos sustentável [36]. Em contrapartida, a abordagem enzimática, com o uso de lipases, esterases e proteases, oferece maior seletividade (com menor formação de coprodutos) e condições de reação mais brandas, sendo assim, um processo mais alinhado aos princípios da química verde [36,37].

### ***Lipofilização Enzimática***

A tecnologia enzimática desempenha um papel de grande importância para o avanço de processos industriais sustentáveis, sendo significativo para enfrentar os desafios de proteção socioambiental e da mudança climática global. Em virtude do crescente nível de conscientização ambiental, a biotecnologia está ganhando rapidamente relevância, uma vez que oferece diversas vantagens em relação às tecnologias convencionais [37–40].

As lipases, conhecidas também como triacilglicerol éster hidrolases (EC 3.1.1.3), são esterases que catalisam seletivamente a hidrólise de ligações éster em substratos insolúveis em água, como óleos e gorduras (triacilgliceróis), liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Os aspectos biológicos, fisiológicos e a aplicação industrial das enzimas lipolíticas têm sido destaque devido a sua forma de ação incomum (embora sejam solúveis em água catalisam reações envolvendo substratos lipofílicos) e devido ao fato de que as lipases podem catalisar reações de síntese sendo estáveis em diversos solventes orgânicos [37,39].

A utilização de lipases oferece uma significativa vantagem em relação à abordagem química devido às características distintas dessas enzimas, que podem ser classificadas de acordo com a especificidade demonstrada. Desta forma, apresentam-se classificadas de acordo com sua: regioseletividade (refere-se à propriedade das lipases em reconhecer a mesma ligação química em diferentes regiões do substrato e reagir apenas com algumas dessas regiões específicas, podendo ser de dois tipos: 1,3-específicas ou não específicas), seletividade de substrato (diz respeito à capacidade das lipases em reconhecer e hidrolisar exclusivamente ou com maior

rapidez um determinado tipo de ácido graxo, através do tamanho da cadeia, o grau de insaturação ou mesmo apresentar seletividade negativa) e enantiosseletividade (refere-se à propriedade das lipases em reagir exclusivamente ou de forma mais eficiente com um determinado isômero do substrato, em comparação com outros isômeros da mesma substância) [37,38].

Lipases são produzidas por uma ampla variedade de seres vivos, no entanto, somente as de origem animal ou microbiana possuem aplicação industrial. Para a síntese de fenolipídios, lipases como Novozym® 435 e Lipozyme RM IM têm sido amplamente utilizadas. A lipase B da levedura *Candida antarctica* (comercializada pela Novozymes com o nome comercial de Lipozyme 435® ou Novozym® 435) é uma lipase de origem fúngica amplamente utilizada na indústria devido a suas múltiplas aplicações. Essa enzima imobilizada apresenta alta atividade e enantiosseletividade em reações de síntese. Além disso, ela é termo resistente em meio orgânico, suportando temperaturas de até 70°C, e é uma enzima inespecífica, demonstrando preferência por ácidos graxos com até 12 carbonos. A lipase do fungo filamentosso *Rhizomucor miehei* (comercializada pela Novozymes com o nome comercial de Lipozyme RM®), é uma enzima 1:3 específica e, assim como a Lipozyme 435®, a Lipozyme RM® também é imobilizada em resina e exibe resistência a altas temperaturas, podendo operar em ambientes com temperaturas de até 70°C [37,41,42].

A lipofilização enzimática apresenta desafios devido às polaridades opostas dos substratos envolvidos, tornando essencial a seleção de um meio reacional adequado para garantir a solubilidade desses substratos e preservar a atividade/estabilidade da enzima. Embora os solventes apolares geralmente preservem a atividade da lipase, os compostos fenólicos hidrofílicos têm solubilidade muito baixa nesses meios. Por outro lado, em meios orgânicos polares os compostos fenólicos apresentam boa solubilidade, mas as lipases frequentemente apresentam atividade limitada [16]. Outro desafio enfrentado é a formação de água como subproduto, o que compromete o equilíbrio da reação resultando na reação de hidrólise competitiva [16,36]. Nesse contexto, os solventes eutéticos profundos (DES) têm sido estudados e utilizados como meios reacionais em biocatálise, destacando-se pelo excelente desempenho como solventes e pela possibilidade de modular a atividade catalítica das enzimas [43]. Além disso, suas características fazem esses solventes serem meios ideais, principalmente em reações de esterificações mediadas por lipases [44].

No Capítulo 3 desta dissertação será apresentada uma revisão bibliográfica abrangendo o período de 2013 a fevereiro/2025, com foco específico na lipofilização enzimática em meio de solventes eutéticos profundos. Contudo, essa revisão também contempla uma abordagem geral sobre lipofilização, aprofundando os conceitos, os mecanismos envolvidos e os principais avanços relacionados ao tema, de modo a complementar os aspectos discutidos anteriormente.

**Solventes Eutéticos Profundos (DES)**

Os solventes eutéticos profundos (DES na sigla em inglês) são uma classe de solventes sustentáveis definidos como misturas de dois ou mais compostos capazes de se associar por meio de interações de ligação de hidrogênio, resultando em uma mistura eutética com temperatura de fusão significativamente inferior à dos componentes individuais. Essas misturas geralmente incluem um doador (HBD) e um acceptor de ligação de hidrogênio (HBA) (Figura 4), cuja forte interação gera um sistema líquido estável à temperatura ambiente, com propriedades de solvente distintas (Figura 5) [45,46].

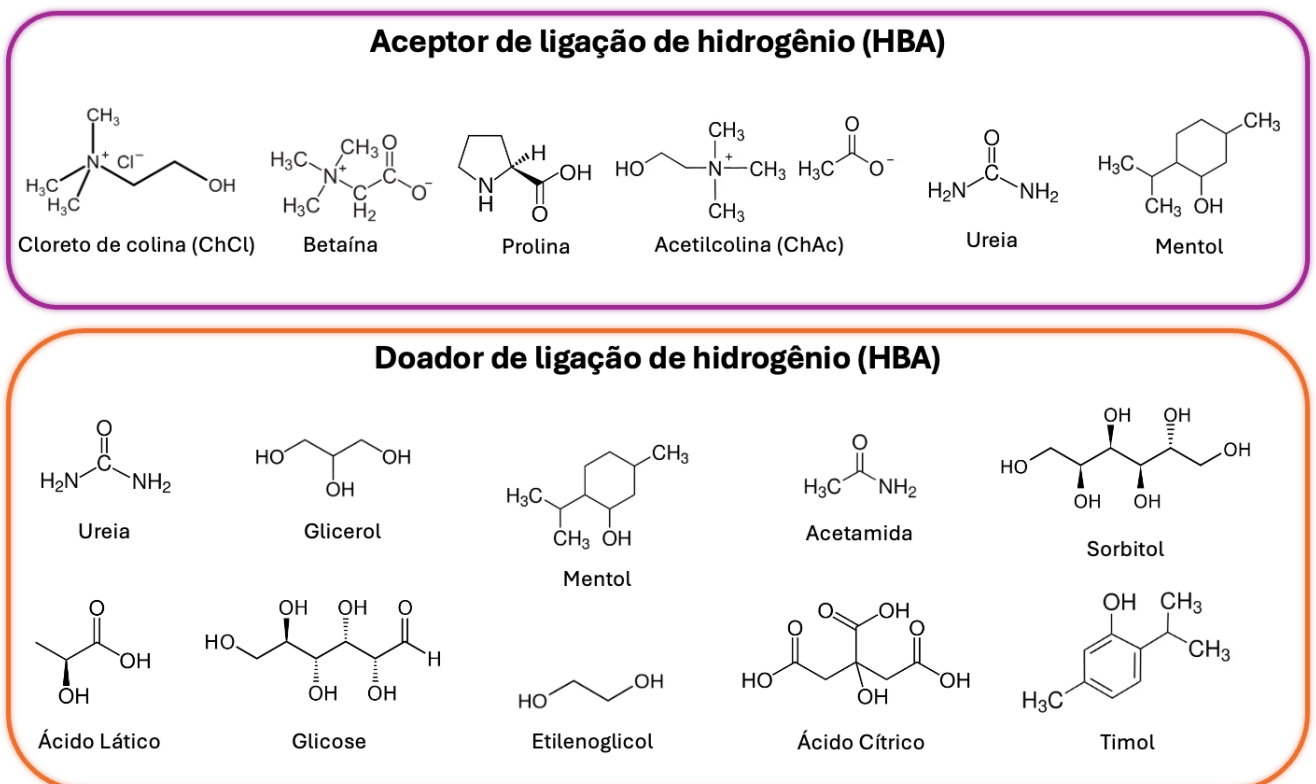


Figura 4. Alguns dos HBA e HBD mais usados para preparação de DES; Referências: [47–49]

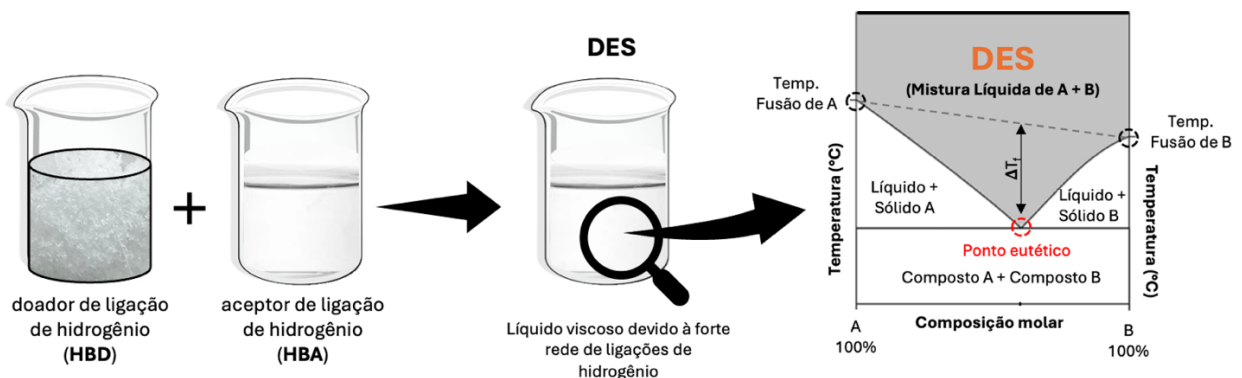


Figura 5. Esquema da formação de um solvente eutético profundo.

Segundo El Achakar e colaboradores [48] a definição de DES ainda é tema de debate, uma vez que a simples presença de um ponto eutético e de interações de hidrogênio não são suficientes para diferenciá-los de outras misturas eutéticas. Para resolver essa ambiguidade, foi proposto que um DES deve apresentar uma depressão de temperatura do ponto eutético maior do que a prevista para uma mistura líquida ideal, tornando-se líquido na temperatura operacional, independentemente da composição. Segundo Alvarez e colaboradores [46], o termo 'solvente eutético profundo' foi inicialmente usado para descrever misturas eutéticas com um ponto de fusão muito inferior ao dos constituintes puros. No entanto, não há correlação entre o ponto de congelamento dos DES e os pontos de fusão dos componentes puros, uma vez que o ponto de congelamento da mistura eutética depende da energia da rede dos DES, da interação entre o par HBA-HBD e das mudanças de entropia decorrentes da formação da fase líquida.

Inicialmente, os DES foram divididos em quatro categorias: Tipo I, compostos por sais de amônio quaternário e cloretos metálicos não hidratados; Tipo II, constituídos por sais de amônio quaternário e hidratos de haletos metálicos; Tipo III, que combinam sais de amônio, fosfônio ou sulfônio com doadores de ligação de hidrogênio (HBD), como álcoois e ácidos carboxílicos; e Tipo IV, formados por cloretos metálicos e HBD. Recentemente, uma nova categoria, Tipo V, foi incluída na classificação geral [45]. Diferente dos outros tipos, os DES Tipo V não possuem contribuição iônica, sendo formados exclusivamente por moléculas não iônicas, nas quais os HBD, como timol e compostos fenólicos, apresentam configuração assimétrica, e os HBA são moléculas que não fornecem locais doadores de ligações de hidrogênio, como éteres, cetonas e ésteres (Figura 6) [46].

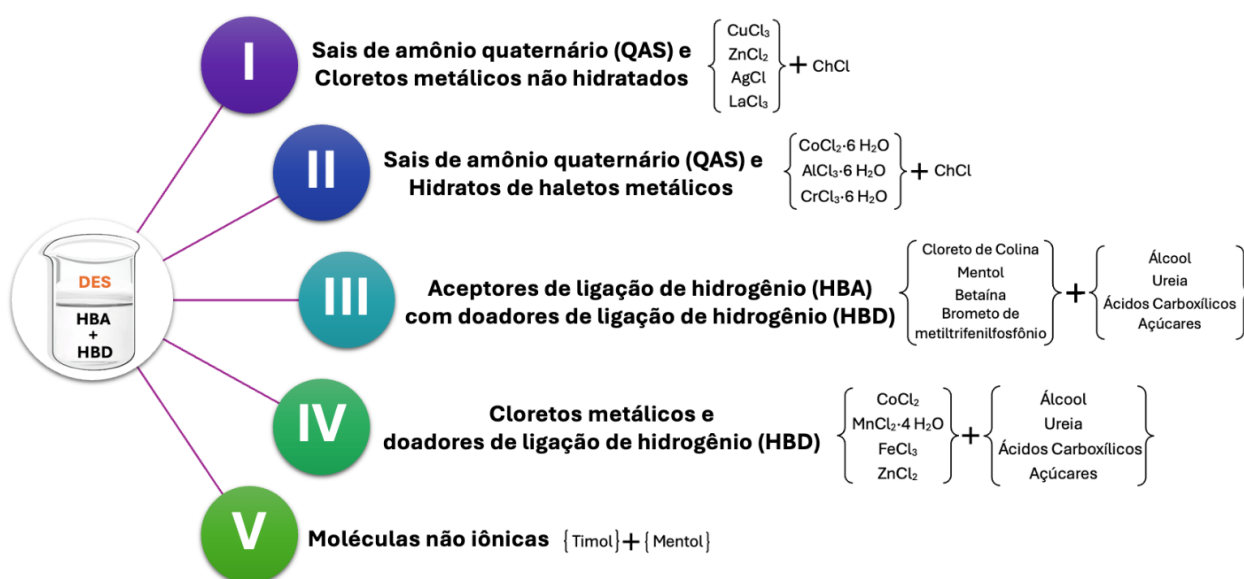


Figura 6. Classificação dos DES quanto aos tipos de DES e exemplos; Referencias: I, II e IV [50,51]; III [47,52] e V [50]

Os DES são classificados em diferentes categorias com base em sua composição e propriedades. Dentre eles, os solventes eutéticos profundos naturais (NaDES) são formados exclusivamente por metabólitos primários, como açúcares, álcoois, aminoácidos, ácidos orgânicos e sais quaternários de amônio naturais, que atuam como doadores e receptores de ligações de hidrogênio [17]. A inclusão de água na composição dos NaDES também é comum, o que contribui para sua versatilidade. Esses solventes foram inicialmente propostos para explicar a alta concentração de metabólitos nas células e, posteriormente, ganharam destaque por seu potencial ambientalmente amigável na extração de biomoléculas valiosas [47,48].

Para Gonzalez-Diaz e Garcia-Nunez [47] os NaDES podem ser classificados em cinco grupos principais: líquidos iônicos (formados por um ácido e uma base), neutros (compostos apenas por açúcares ou poliálcoois), neutros com ácidos (combinando açúcares/poliálcoois com ácidos orgânicos), neutros com bases (misturando açúcares/poliálcoois com bases orgânicas) e aqueles contendo aminoácidos (compostos por aminoácidos e açúcares ou ácidos orgânicos). Outra categoria engloba os DES hidrofóbicos, que utilizam compostos de cadeias longas, como ácidos graxos, mas também monoterpenos como mentol e timol. Existem ainda os DES terapêuticos (TheDES, na sigla em inglês) formulados com ingredientes farmacêuticos ativos, como ibuprofeno e lidocaína, ampliando seu potencial de uso em aplicações biomédicas (Tabela 1)[48].



Tabela 1. Exemplos de HBA e HBD em NaDES, TheDES e DES hidrofóbicos

	HBA	HBD	Usos	Referencias
NaDES	Sais de amônio quaternário (ex: cloreto de colina, betaína) Aminoácidos (ex: alanina, prolina) Ácidos Orgânicos (ex: ác. láctico, ác. oxálico, ác. málico) Poliálcoois (ex: glicerol, etilenoglicol, sorbitol) Açúcares (ex: glicose, frutose, xilose) Amida (ex: ureia)	Aminoácidos (ex: alanina, prolina) Ácidos Orgânicos (ex: ác. láctico, ác. oxálico, ác. málico) Poliálcoois (ex: glicerol, etilenoglicol, sorbitol) Açúcares (ex: glicose, frutose, xilose) Amida (ex: ureia)	Biocatálise Extração de produtos naturais Pré-tratamento de biomassa Formulações terapêuticas Engenharia de materiais	[47,53–55]
TheDES	cloreto de colina mentol timol	ibuprofeno ácido acetilsalicílico ácido benzóico	Ingredientes farmacêuticos	[56–59]
DES Hidrofóbico	Terpenos (ex: mentol, timol) Sais de amônio quaternário (ex: cloreto de metiltrioctilamônio, brometo de tetraoctilamônio) Ácidos Carboxílicos pequenos (ex: ác. láctico, ác. pirúvico, ác. acético) Ácido graxo (ex: ác. palmítico, ác. láurico, ác. decanóico, ác. dodecanóico)	Terpenos (ex: mentol, timol) Álcoois (ex: octanol, 1-decanol) Ácidos Carboxílicos (ex: ác. láctico, ác. pirúvico, ác. levulínico) Ácido graxo (ex: ác. oleico, ác. palmítico, ác. decanóico, ác. dodecanóico)	Biocatálise Extração de produtos naturais Biotecnologia farmacêutica	[60–63]

Uma vez que os DES podem ser projetados modificando os HBA ou HBD ou a razão molar dos componentes puros [46], as interações entre esses constituintes permitem a obtenção de solventes com propriedades físico-químicas ajustáveis, como hidrofobicidade, hidrofiliabilidade, acidez, alcalinidade ou neutralidade, adaptadas a aplicações específicas [64,65]. As propriedades físico-químicas dos DES são, portanto, altamente dependentes de sua composição, e a rede de ligações de hidrogênio formada entre os componentes é fundamental para determinar suas características, como ponto de fusão, densidade, viscosidade, condutividade, acidez, polaridade e estabilidade térmica. Fatores como a natureza e a razão molar dos constituintes (HBA e HBD), o teor de água, a temperatura e a pureza dos reagentes influenciam diretamente essas propriedades. Sendo assim, a escolha dos componentes e o método de preparação permitem a configurar essas características para diversas aplicações [45,64].

Os DES apresentam propriedades físico-químicas interessantes quando comparadas aos solventes orgânicos normalmente utilizados na extração e solubilização de compostos fenólicos, sendo uma das principais razões por trás do crescente interesse por esses solventes. Entre suas principais características, destacam-se a pressão de vapor insignificante, alta estabilidade térmica e não inflamabilidade. Além disso, seus componentes geralmente são derivados de fontes renováveis, tornando esses solventes biodegradáveis e atóxicos. Outra vantagem comparativa é a facilidade de preparação e custo relativamente baixo [66]. Apesar das inúmeras vantagens, esses sistemas também apresentam algumas limitações, como a elevada viscosidade, que impacta negativamente a transferência de massa e, conseqüentemente, a eficiência de processos de extração e reações catalíticas [49,65]. Outra limitação é a recuperação e o reuso dos DES, uma vez que sua baixa volatilidade impede etapas simples, como evaporação, frequentemente empregadas com solventes convencionais, resultando na necessidade de processos adicionais nem sempre eficientes [67]. Somado a isso, há a possibilidade de interferências em análises instrumentais, com necessidade de diluição ou troca de solvente para adequação a sistemas cromatográficos e espectrométricos [68], além da sensibilidade desses solventes ao teor de água, que embora contribua para a redução da viscosidade, também pode modificar drasticamente propriedades críticas, como a polaridade, a densidade, a condutividade e até o comportamento termodinâmico do sistema [48,69]. Outra limitação relevante é a tendência higroscópica de muitos DES, especialmente os de origem natural (NaDES), o que pode gerar instabilidades durante o armazenamento e flutuações indesejadas nas propriedades do sistema [70].

A presença de água nos DES é inevitável devido ao caráter higroscópico de muitos de seus componentes. Além disso, em NaDES, a água pode fazer parte da própria estrutura supramolecular, participando da formação do sistema e influenciando sua estabilidade e

propriedades de polaridade [48,65]. A água tem um grande efeito tanto na estruturação quanto nas forças intermoleculares dos DES, quanto em suas propriedades físico-químicas. Assim, por ter um grande efeito em algumas propriedades termodinâmicas, é necessário medir e relatar o teor de água, bem como a atividade de água, desses solventes. A influência da água vai além da simples modificação de propriedades físico-químicas, podendo comprometer a integridade estrutural dos DES ao interferir nas interações intra- e inter-moleculares que sustentam sua rede supramolecular [45,48]. Estudos indicam que, em pequenas quantidades, a água é incorporada à estrutura do DES sem destruí-la, ajustando suas propriedades e melhorando seu desempenho em diversas aplicações, mas com o aumento da concentração há a ruptura das ligações de hidrogênio que ocorre progressivamente [48,64] e, apesar de sua estrutura supramolecular ser mantida até um teor de água de 40-50%, acima desse limite, os componentes passam a se comportar como parte de uma solução aquosa [47].

A polaridade é uma propriedade fundamental, pois reflete a capacidade geral de solvatação dos solventes, sendo determinante na seleção de um DES de acordo com sua aplicação. Esta propriedade é frequentemente estimada por meio de parâmetros solvatocrômicos [48] e está diretamente relacionada à natureza de seus componentes. Além disso, a polaridade pode ser alterada pela adição de água, o que impacta sua capacidade solubilizante para substâncias polares e até mesmo para algumas insolúveis em água [71]. A acidez e basicidade dos DES desempenham um papel crucial em processos de extração, reações orgânicas e catálise, sendo influenciadas principalmente pelos valores de pH de seus componentes individuais [46]. Este parâmetro é influenciado pela natureza do doador de ligação de hidrogênio (HBD) [72] e o pH tende a diminuir linearmente com o aumento da temperatura devido à dependência da estrutura do sistema em doadores de ligações de hidrogênio [65].

O ponto de fusão dos DES é consideravelmente menor do que o de seus componentes puros, sendo essa característica essencial na definição de DES, uma vez que devem possuir fusão próxima à temperatura ambiente [45]. A formação de um DES ocorre devido à redução da energia de rede, resultante da interação do HBD e HBA, que diminui a energia do sistema, gera um ponto de fusão inferior ao de seus componentes puros e favorece a estabilidade da fase líquida [65]. A determinação da curva de solubilidade ideal dos DES exige a obtenção de um diagrama de fases e o conhecimento das propriedades de fusão dos compostos puros, visto que fatores como a escolha do HBD, a natureza do HBA e a razão molar entre eles afetam diretamente esse parâmetro [48,65]. Além disso, a temperatura de fusão é afetada pelo tamanho e pela carga dos íons: íons maiores e de menor carga exigem menos energia para romper as interações, resultando na depressão do ponto de congelamento [45].

Propriedades como a densidade e a viscosidade apresentam influência de fatores semelhantes e por isso estão sempre vinculadas quando discutidas [72]. A densidade dos DES é uma propriedade intensiva e fundamental que influencia diversos fatores, como temperatura, razão molar entre doador e aceptor de ligação de hidrogênio (HBD:HBA), pressão e teor de água [45]. A maioria dos DES apresenta densidade superior à da água, com valores variando entre 1,0 e 1,35 g.cm<sup>-3</sup> a 25 °C [65]. A densidade tende a diminuir linearmente com o aumento da temperatura devido ao movimento acelerado das moléculas, que cria mais espaço livre no sistema [71]. Esse efeito é intensificado pelo aumento do comprimento da cadeia alquílica do HBD [65], que reduz a interação da ligação de hidrogênio por impedimento estérico, levando a um maior volume livre e, conseqüentemente, a uma menor densidade. A adição de água ao sistema também impacta significativamente a densidade, reduzindo-a devido ao aumento do volume livre molar [45,71]. A interação entre os componentes do DES é outro fator crucial, pois um aumento na força dessas interações gera uma densidade mais alta, enquanto a interrupção da rede de ligações de hidrogênio pode levar a uma "densidade mínima" em determinadas composições [69]. O acréscimo de um componente quaternário, por exemplo, pode desestabilizar essa rede, diminuindo a densidade do sistema [72]. A escolha dos precursores e de suas proporções permite o ajuste da densidade dos DES, tornando essa propriedade um fator determinante para suas aplicações em diferentes processos. Em contraste com os DES hidrofílicos, os DES hidrofóbicos podem apresentar densidades menores que a da água [48].

Os DES são caracterizados por uma alta viscosidade em temperatura ambiente, atribuída à forte rede de ligações entre HBD e HBA [48], além de interações eletrostáticas e forças de van der Waals [65]. A viscosidade e a temperatura possuem uma relação inversa, pois o aumento da temperatura reduz a rede de ligações de hidrogênio, diminuindo a resistência ao fluxo [45,65,71]. Essa viscosidade pode ser de 100 a 1000 vezes maior do que a de solventes orgânicos convencionais e depende de fatores como a composição química dos HBD e HBA, a razão molar entre eles, a temperatura e o teor de água [48,71]. DES contendo açúcares apresentam viscosidades extremamente elevadas devido à maior capacidade de ligação de hidrogênio [72], enquanto os à base de poliálcoois apresentam viscosidades menores devido a interações intermoleculares mais fracas. Além disso, o aumento do peso molecular e do comprimento da cadeia alquílica do HBD também resulta em maior viscosidade [71]. Além disso, o tamanho dos íons e o volume de espaços vazios no líquido também afetam essa propriedade, apresentando assim um equilíbrio entre a viscosidade, o poder de solvatação e a mobilidade das moléculas no sistema [64,72]. A alcalinidade e a acidez dos DES também desempenham um papel fundamental

na extração, influenciando diretamente as interações com os solutos-alvo e afetando o rendimento do processo [65].

Os DES apresentam diversas aplicações, incluindo extração de compostos-alvo, síntese orgânica, separações e catálises e, por serem derivados de ingredientes naturais, são considerados mais seguros para o meio ambiente e para o uso humano [47]. Apresentam alta eficiência na extração e dissolução de compostos polares e apolares, sendo considerados uma alternativa promissora aos solventes orgânicos convencionais [73,74]. A eficiência da extração depende diretamente das interações intermoleculares entre o DES e o composto-alvo, sendo maior quando essas interações são de forças equivalentes. Para otimizar esse processo, a adição de água, a modificação da proporção molar dos componentes do DES ou o aumento moderado da temperatura são estratégias frequentemente empregadas [75]. No entanto, a viscosidade dos DES pode limitar sua eficiência de extração, tornando essencial o ajuste de suas propriedades, como coeficiente de partição, polaridade, estabilidade térmica e viscosidade [76]. A polaridade dos DES desempenha um papel crucial na extração, influenciando o rendimento e a qualidade dos compostos extraídos [65]. A adição de água pode modificar a polaridade do solvente, afetando diretamente sua capacidade de dissolução. Embora, em alguns casos, a adição de água possa diminuir a eficiência da extração, uma adição controlada pode aumentar a eficácia na extração de compostos bioativos específicos [47]. Além disso, a escolha entre DES hidrofóbicos e hidrofílicos deve considerar o composto-alvo e a matriz da amostra (sólida ou líquida), seguindo o princípio de similaridade e intermiscibilidade, no qual solventes com polaridade semelhante à do soluto tendem a apresentar maior eficiência de extração [71].

O papel dos DES na biocatálise de modulação das interações enzimáticas por meio da variação dos doadores e aceptores de ligações de hidrogênio e de suas razões molares tem permitido avanços em processos industriais, por exemplo, para síntese de lipídios estruturais na indústria alimentícia. Além disso, a engenharia de solventes tem demonstrado que a combinação e a composição dos DES podem impactar seletivamente diferentes tipos de enzimas, ampliando suas aplicações e garantindo maior rendimento e qualidade dos produtos gerados [43,77].

### ***DES e lipases***

O emprego de NaDES em reações catalisadas por enzimas pode representar uma alternativa viável para conduzir essas transformações em um meio que simula as condições fisiológicas intra ou extracelulares [78]. Para essas reações, a seleção do DES adequado é um fator crítico, uma vez que os constituintes desses solventes podem competir com o substrato da reação [79]. As lipases, assim como outras hidrolases, possuem a particularidade de reverter a reação de hidrólise

quando em condições reacionais com baixa atividade de água [37]. No entanto, a formação da ligação éster gera água como subproduto, o que pode comprometer o rendimento da reação. Sistemas baseados em DES, tendem a dispersar a água liberada no meio, preservando as interações das ligações de hidrogênio e deslocando a reação ao favorecimento de altas taxas de conversão na esterificação [80].

Os estudos iniciados no final da década de 2000 sobre o uso de DES como meios reacionais em biocatálise demonstraram que hidrolases específicas mantinham elevada atividade catalítica nesses sistemas [81]. Desde então, diversos autores destacaram que determinadas enzimas apresentam desempenho superior em DES em comparação aos solventes orgânicos tradicionais, uma vez que os DES podem interagir diretamente tanto com o sítio ativo da enzima quanto com o substrato, facilitando essas reações [82,83]. Além disso, a estrutura química dos DES, como consequência da presença de grupos funcionais como carboxila e hidroxila, influencia diretamente as propriedades catalíticas das enzimas, assim como o comprimento das cadeias carbônicas e as interações entre a enzima e o solvente [43,83]. Outro fator observado é a alta solubilidade de compostos polares, proporcionada pela ampla faixa de polaridade desses solventes, além da estabilidade enzimática, mesmo sob condições adversas, o que reforça sua adequação para aplicações como a lipofilização enzimática catalisada por lipase [16].

Arnodo e colaboradores [78] realizaram uma revisão bibliográfica das reações de esterificação e transesterificação catalisadas por lipases na presença de DES. Nesse levantamento observaram que, entre os estudos que compararam diferentes formulações de DES, os melhores rendimentos foram obtidos em meios contendo cloreto de colina, glicerol e ureia. Além disso, constataram que a adição de água aos DES resultou no aumento da atividade enzimática e do rendimento da reação e que a adsorção da água produzida durante a esterificação contribuiu para o aumento da eficiência de conversão. Também foi relatado que a atividade enzimática foi influenciada pela razão molar dos substratos, assim como pela atividade de água presente nos DES. Recentemente, Zhou e colaboradores [43] realizaram uma revisão bibliográfica focada no efeito dos DESs na atividade, estabilidade e seletividade enzimática a fim de esclarecer esses efeitos na estrutura, conformação e propriedades catalíticas das enzimas. Nesse levantamento, os autores corroboram os pontos apontados anteriormente por Arnodo e colaboradores [75] quanto à relação da presença de água e atividade catalítica. Constataram ainda que os DES podem impactar de maneiras diferentes a estabilidade e a atividade das enzimas a partir da combinação de HBD e HBA, com destaque para os sistemas baseados em glicerol e ureia, que favoreceram a atividade de lipases. Adicionalmente, a seletividade enzimática pode ser modulada

por esses solventes, conforme evidenciado na melhoria da seletividade da lipase de *Candida antarctica* em DES contendo cloreto de colina [43,64,84–86].

Como citado anteriormente, no Capítulo 3 será apresentada uma revisão bibliográfica sobre lipofilização enzimática em DES. Nesta revisão, serão abordados de forma mais abrangente o tema da lipofilização, com enfoque em estudos realizados entre 2012 e fevereiro/2025.

### **Métodos de quantificação de compostos fenólicos**

A análise de alimentos compreende um processo amplo envolvendo a extração, identificação e quantificação de diversas classes de compostos presentes em matrizes naturais. Para obter os compostos fenólicos provenientes das fontes alimentares, têm sido estabelecidos variados métodos de extração, sendo a abordagem mais comum a utilização de solventes orgânicos. O potencial dos DES se destaca nesses processos, como solventes ecologicamente viáveis, sendo categorizados como "solventes verdes" devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e caráter sustentável. A detecção e quantificação de metabólitos desempenham um papel fundamental na garantia da segurança e qualidade de alimentos e produtos funcionais correlatos [17,87].

Os métodos aplicados na análise de compostos fenólicos são classificados em: i) determinação de compostos fenólicos totais, ii) para a determinação quantitativa de um grupo ou classe e/ou iii) avaliação individual. Os compostos fenólicos podem ser detectados e quantificados por meio de diversas técnicas e equipamentos. Técnicas analíticas de alta precisão, porém de alto custo, são utilizadas para avaliar a composição química individual, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), que pode estar em conjunto com detectores de arranjo de diodos (DAD) ou de fluorescência (FL), além da espectrometria de massas (MS). Os métodos espectrofotométricos UV/VIS são amplamente aplicados na literatura devido ao seu tempo de análise reduzido, custo relativamente baixo e capacidade de diminuir a necessidade de padrões analíticos individuais. Além disso, eles demonstram alta repetibilidade e reprodutibilidade, não exigem equipamentos complexos nem pessoal especialmente treinado e seus protocolos podem ser aplicados facilmente em diferentes tipos de amostras, sejam sólidas ou líquidas [88].

Devido às propriedades dos DES, foi diagnosticada uma grande dificuldade para quantificação, por meios espectrofotométricos, de compostos fenólicos nesses solventes. Ao se analisar a literatura específica que emprega a quantificação de compostos fenólicos em DES, observa-se que a metodologia mais utilizada é o método colorimétrico baseado no reagente de Folin-Ciocalteu, conforme observado em trabalhos como os de González-Díaz e García-Núñez [47], Fanali e colaboradores [89], Arzola-Rodríguez e colaboradores [35], Bezerra e colaboradores

[31,33], Zardo e colaboradores [90], Albe Slabi e colaboradores [91], Pires e colaboradores [92], Mamilla e colaboradores [93], Martinović e colaboradores [94], Chanioti e Tzia [95], Radošević e colaboradores [96] além de outros compilados por Bezerra e colaboradores [17]. Apesar de sua ampla adoção, muitos autores manifestam preocupações com relação às limitações do método de Folin-Ciocalteu. Dentre as principais ressalvas estão a baixa seletividade, uma vez que o reagente reage com qualquer composto que possua potencial redutor — não exclusivamente com compostos fenólicos [47,89]. Além disso, destacam-se as interferências geradas pelos próprios DES, que podem atuar como agentes redutores ou oxidantes e afetar diretamente a precisão dos resultados [90,92,94]. Essas interferências são ainda mais críticas, pois podem levar à superestimativa dos teores de compostos fenólicos, especialmente quando os DES apresentam ureia, açúcares, ácidos orgânicos ou aminoácidos em sua composição, componentes estes que também possuem atividade redutora [95]. Uma das principais limitações observadas está relacionada à formulação do DES quando na presença de cloreto de colina, pois forma um precipitado insolúvel quando entra em contato com o reagente de Folin-Ciocalteu, interferindo significativamente na leitura da absorbância [31,47,89]. Esse fenômeno já foi claramente documentado em trabalhos anteriormente mencionados [31,33,47,89–91]. Essa precipitação ocorre devido à reação entre os ânions fosfato-molibdato do reagente Folin e o cátion colina, levando à formação de complexos pouco solúveis [31]. Além disso, o próprio cloreto de colina possui caráter redutor, podendo em uma superestimativa dos teores de compostos fenólicos, mesmo em sua ausência [92,94,95]. Outro fator de muita importância é a influência do pH para o desempenho do método Folin-Ciocalteu [31,33]. Muitos DES apresentam pH de levemente ácido até muito ácido, o que prejudica a ocorrência da reação colorimétrica, reduzindo a velocidade e a extensão da formação do complexo azul característico da reação [92,94]. A ocorrência de pH ácido pode levar à formação de produtos intermediários instáveis que prejudicam a leitura da absorbância e comprometem os resultados [95]. Esse processo já foi discutido e documentado por diversos autores, que relataram a necessidade de realizar ajustes no pH dos extratos antes da aplicação do método. A elevada viscosidade dos DES é outra variável crítica que compromete a aplicação do reagente de Folin-Ciocalteu. DES compostos por cloreto de colina associado a compostos como glicerol, ácido láctico ou glicose apresentam alta viscosidade, o que dificulta a homogeneização dos reagentes com a amostra, levando a uma reação incompleta [96]. A alta viscosidade retarda ou impede a formação do complexo azul de heteropolimolibdato-tungstato reduzido, fundamental para a detecção dos compostos redutores [90,92]. Essa condição pode ser contornada pela diluição do extrato, mas diluições excessivas diluem os compostos fenólicos, afetando a sensibilidade da análise [47,89]. Essas questões aparecem de forma recorrente nas



discussões dos trabalhos, que apontam a necessidade de ajustes nas condições experimentais ou até mesmo consideram o uso de métodos mais específicos [97]. Muitos autores relatam a adoção de metodologias mais robustas e seletivas, como HPLC, HPLC-QToF e outras técnicas cromatográficas acopladas a detectores de alta resolução [52,98]. Esses métodos, embora mais precisos e seletivos, possuem custo elevado, demandam infraestrutura sofisticada e maior tempo de análise, o que limita sua aplicabilidade em determinados contextos [47,55]. Além disso, muitos estudos também aplicam análises complementares, como DPPH, ABTS e FRAP, que, apesar de não serem métodos diretos de quantificação de compostos fenólicos, oferecem uma perspectiva do potencial antioxidante dos extratos [99,100]. Adicionalmente, observa-se que não há uma ampla variedade de trabalhos que explorem métodos alternativos aos que se utilizam do reagente de Folin-Ciocalteu em sistemas DES, o que demonstra uma lacuna metodológica na área. Diante disso, justifica-se a realização do trabalho, apresentado no Capítulo 2, que buscou propor e validar alternativas metodológicas para a quantificação de compostos fenólicos em sistemas DES.

## Referências

- [1] I. Gutiérrez-del-Río, S. López-Ibáñez, P. Magadán-Corpas, L. Fernández-Calleja, Á. Pérez-Valero, M. Tuñón-Granda, E.M. Miguélez, C.J. Villar, F. Lombó, Terpenoids and Polyphenols as Natural Antioxidant Agents in Food Preservation, *Antioxidants* 10 (2021) 1264. <https://doi.org/10.3390/antiox10081264>.
- [2] D. Wang, H. Xiao, X. Lyu, H. Chen, F. Wei, Lipid oxidation in food science and nutritional health: A comprehensive review, *Oil Crop Science* 8 (2023) 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.ocsci.2023.02.002>.
- [3] M.D. Erickson, D.P. Yevtushenko, Z.-X. Lu, Oxidation and Thermal Degradation of Oil during Frying: A Review of Natural Antioxidant Use, *Food Reviews International* 39 (2023) 4665–4696. <https://doi.org/10.1080/87559129.2022.2039689>.
- [4] J. Pokorný, Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants?, *Euro J Lipid Sci & Tech* 109 (2007) 629–642. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700064>.
- [5] A. Zeb, Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods, *J Food Biochem* 44 (2020). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13394>.
- [6] Í. Gulcin, Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview, *Arch Toxicol* 94 (2020) 651–715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>.
- [7] M. Carochi, I.C.F.R. Ferreira, A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives, *Food and Chemical Toxicology* 51 (2013) 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>.
- [8] O.R. Alara, N.H. Abdurahman, C.I. Ukaegbu, Extraction of phenolic compounds: A review, *Current Research in Food Science* 4 (2021) 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.crfcs.2021.03.011>.

- [9] B.R. Albuquerque, S.A. Heleno, M.B.P.P. Oliveira, L. Barros, I.C.F.R. Ferreira, Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges, *Food Funct.* 12 (2021) 14–29. <https://doi.org/10.1039/D0FO02324H>.
- [10] P.R. Augusti, G.M.M. Conterato, C.C. Denardin, I.D. Prazeres, A.T. Serra, M.R. Bronze, T. Emanuelli, Bioactivity, bioavailability, and gut microbiota transformations of dietary phenolic compounds: implications for COVID-19, *The Journal of Nutritional Biochemistry* 97 (2021) 108787. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108787>.
- [11] L.M.L. Nollet, J.A. Gutierrez-Urbe, eds., *Phenolic compounds in food: characterization and analysis*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton London New York, 2018.
- [12] M.M. Vuolo, V.S. Lima, M.R. Maróstica Junior, Phenolic Compounds, in: *Bioactive Compounds*, Elsevier, 2019: pp. 33–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5>.
- [13] M.C. Figueroa-Espinoza, M. Laguerre, P. Villeneuve, J. Lecomte, From phenolics to phenolipids: Optimizing antioxidants in lipid dispersions, *Lipid Technology* 25 (2013) 131–134. <https://doi.org/10.1002/lite.201300277>.
- [14] Y. Lang, N. Gao, Z. Zang, X. Meng, Y. Lin, S. Yang, Y. Yang, Z. Jin, B. Li, Classification and antioxidant assays of polyphenols: a review, *Journal of Future Foods* 4 (2024) 193–204. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2023.07.002>.
- [15] M.F. Ramadan, *Pheno-phospholipids and Lipo-phenolics: Novel Structured Antioxidants*, Springer International Publishing, Cham, 2021. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-67399-4>.
- [16] E. Durand, J. Lecomte, P. Villeneuve, Are emerging deep eutectic solvents (DES) relevant for lipase-catalyzed lipophilizations?, *OCL* 22 (2015) D408. <https://doi.org/10.1051/ocl/2015026>.
- [17] F.D.S. Bezerra, D.F. Da Costa, M.G.B. Koblitz, Aproveitamento integral de matérias-primas oleaginosas com “solventes verdes”: revisão e oportunidades, *RSD* 9 (2020) e372985388. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i8.5388>.
- [18] H. Lu, Z. Tian, Y. Cui, Z. Liu, X. Ma, Chlorogenic acid: A comprehensive review of the dietary sources, processing effects, bioavailability, beneficial properties, mechanisms of action, and future directions, *Comp Rev Food Sci Food Safe* 19 (2020) 3130–3158. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12620>.
- [19] L. Zeng, R. Xiang, C. Fu, Z. Qu, C. Liu, The Regulatory effect of chlorogenic acid on gut-brain function and its mechanism: A systematic review, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 149 (2022) 112831. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112831>.
- [20] M. Naveed, V. Hejazi, M. Abbas, A.A. Kamboh, G.J. Khan, M. Shumzaid, F. Ahmad, D. Babazadeh, X. FangFang, F. Modarresi-Ghazani, L. WenHua, Z. XiaoHui, Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 97 (2018) 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>.
- [21] L. Wang, X. Pan, L. Jiang, Y. Chu, S. Gao, X. Jiang, Y. Zhang, Y. Chen, S. Luo, C. Peng, The Biological Activity Mechanism of Chlorogenic Acid and Its Applications in Food Industry: A Review, *Front. Nutr.* 9 (2022) 943911. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.943911>.
- [22] Institute of Agroindustries, Technological University of the Mixteca, Mexico, N.F. Santos-Sánchez, R. Salas-Coronado, R. Valadez-Blanco, B. Hernández-Carlos, P.C. Guadarrama-Mendoza, Natural antioxidant extracts as food preservatives, *Acta Sci Pol Technol Aliment* 16 (2017) 361–370. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.0530>.

- [23] M.U. Makiso, Y.B. Tola, O. Ogah, F.L. Endale, Bioactive compounds in coffee and their role in lowering the risk of major public health consequences: A review, *Food Science & Nutrition* 12 (2024) 734–764. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3848>.
- [24] T.D. Alexandrino, M.G. Da Silva, R.A. Ferrari, A.L.T.G. Ruiz, R.M.T. Duarte, F.M. Simabuco, R.M.N. Bezerra, M.T.B. Pacheco, Evaluation of some in vitro bioactivities of sunflower phenolic compounds, *Current Research in Food Science* 4 (2021) 662–669. <https://doi.org/10.1016/j.crf.2021.09.007>.
- [25] M. Kahlaoui, S. Borotto Dalla Vecchia, F. Giovine, H. Ben Haj Kbaier, N. Bouzouita, L. Barbosa Pereira, G. Zeppa, Characterization of Polyphenolic Compounds Extracted from Different Varieties of Almond Hulls (*Prunus dulcis* L.), *Antioxidants* 8 (2019) 647. <https://doi.org/10.3390/antiox8120647>.
- [26] M. Labeiko, F. Gladkiy, S. Bochkarev, V. Mazaeva, O. Litvinenko, T. Ovsianikova, S. Zhynova, N. Sytnik, Analysis of the influence of technological parameters of the chlorogenic acid extraction process from sunflower meal on the degree of its extraction, *TAPR* 1 (2020) 38–43. <https://doi.org/10.15587/2312-8372.2020.198765>.
- [27] G. Náthia-Neves, E. Alonso, Valorization of sunflower by-product using microwave-assisted extraction to obtain a rich protein flour: Recovery of chlorogenic acid, phenolic content and antioxidant capacity, *Food and Bioproducts Processing* 125 (2021) 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.10.008>.
- [28] Z. Ali, B. Subeshan, Md.A. Alam, E. Asmatulu, J. Xu, Recent progress in extraction/transesterification techniques for the recovery of oil from algae biomass, *Biomass Conv. Bioref.* 13 (2023) 2553–2569. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01326-y>.
- [29] V. Vieira, M.A. Prieto, L. Barros, J.A.P. Coutinho, I.C.F.R. Ferreira, O. Ferreira, Enhanced extraction of phenolic compounds using choline chloride based deep eutectic solvents from *Juglans regia* L., *Industrial Crops and Products* 115 (2018) 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.029>.
- [30] J. Wu, M. Su, A. Hu, H. Wang, Extraction and recovery of chlorogenic acid from sunflower disks using a high-efficiency system composed of deep eutectic solvents and macroporous resins, *Food Processing Preservation* 46 (2022). <https://doi.org/10.1111/jfpp.16856>.
- [31] F.D.S. Bezerra, G.S.M. Ramos, M.G.D.O. Carvalho, M.G.B. Koblitz, Natural deep eutectic solvents characteristics determine their extracting and protective power on chlorogenic acids from sunflower meal, *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 37 (2024) 101430. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2024.101430>.
- [32] G. Soares Macello Ramos, F. De Sousa Bezerra, R. Nogueira Pereira Da Silva, M. Grilo De Oliveira Carvalho, M. Gabriela Bello Koblitz, Evaluating spectrophotometric and antioxidant activity methods for phenolic compounds quantification in natural deep eutectic solvents, *Journal of Molecular Liquids* 415 (2024) 126375. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.126375>.
- [33] F.D.S. Bezerra, G.M.S. Ramos, M.G.D.O. Carvalho, H.S. Carvalho, J.P. De Souza, S.L. De Carvalho Neto, S.M.A.G.U. De Souza, D.C.D.C. Ferraz, M.G.B. Koblitz, Cytotoxic potential of sunflower meal NaDES and liquid-liquid extracts, *Food Chemistry* 474 (2025) 143148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.143148>.
- [34] B. Zieniuk, E. Białecka-Florjańczyk, K. Wierzychowska, A. Fabiszewska, Recent advances in the enzymatic synthesis of lipophilic antioxidant and antimicrobial compounds, *World J Microbiol Biotechnol* 38 (2022) 11. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03200-5>.

- [35] S.I. Arzola-Rodríguez, L.-N. Muñoz-Castellanos, C. López-Camarillo, E. Salas, Phenolipids, Amphiphilic Phenolic Antioxidants with Modified Properties and Their Spectrum of Applications in Development: A Review, *Biomolecules* 12 (2022) 1897. <https://doi.org/10.3390/biom12121897>.
- [36] M. Mardani, K. Badakné, J. Farmani, F. Shahidi, Enzymatic lipophilization of bioactive compounds with high antioxidant activity: a review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 64 (2024) 4977–4994. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2147268>.
- [37] M.G.B. Koblitz, *Bioquímica de alimentos: teoria e aplicações práticas*, 2ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2019.
- [38] L. Batistella, *PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL EM SOLVENTE ORGÂNICO EM BANHO DE ULTRASSOM*, (n.d.).
- [39] R.N. Vilas Bôas, H.F. De Castro, A review of synthesis of esters with aromatic, emulsifying, and lubricant properties by biotransformation using lipases, *Biotech & Bioengineering* 119 (2022) 725–742. <https://doi.org/10.1002/bit.28024>.
- [40] K. Vivek, G.S. Sandhia, S. Subramaniyan, Extremophilic lipases for industrial applications: A general review, *Biotechnology Advances* 60 (2022) 108002. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108002>.
- [41] S.H. Albayati, M. Masomian, S.N.H. Ishak, M.S.B. Mohamad Ali, A.L. Thean, F.B. Mohd Shariff, N.D.B. Muhd Noor, R.N.Z. Raja Abd Rahman, Main Structural Targets for Engineering Lipase Substrate Specificity, *Catalysts* 10 (2020) 747. <https://doi.org/10.3390/catal10070747>.
- [42] J.-Y. Park, K.-M. Park, Lipase and Its Unique Selectivity: A Mini-Review, *Journal of Chemistry* 2022 (2022) 1–11. <https://doi.org/10.1155/2022/7609019>.
- [43] D. Zhou, X. Chen, G. Li, M. Zhao, D. Li, Effect of deep eutectic solvents on activity, stability, and selectivity of enzymes: Novel insights and further prospects, *International Journal of Biological Macromolecules* 284 (2025) 138148. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.138148>.
- [44] S.H. Kim, S. Park, H. Yu, J.H. Kim, H.J. Kim, Y.-H. Yang, Y.H. Kim, K.J. Kim, E. Kan, S.H. Lee, Effect of deep eutectic solvent mixtures on lipase activity and stability, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 128 (2016) 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.03.012>.
- [45] K.A. Omar, R. Sadeghi, Database of deep eutectic solvents and their physical properties: A review, *Journal of Molecular Liquids* 384 (2023) 121899. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.121899>.
- [46] M.S. Álvarez, M.A. Longo, A. Rodríguez, F.J. Deive, The role of deep eutectic solvents in catalysis. A vision on their contribution to homogeneous, heterogeneous and electrocatalytic processes, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 132 (2024) 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2023.11.030>.
- [47] A. Gonzalez–Diaz, J.A. García–Núñez, Hydrophilic deep eutectic solvents: A new generation of green and safe extraction systems for bioactive compounds obtaining from natural oil & fats – A review, *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 36 (2023) 101278. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101278>.
- [48] T. El Achkar, H. Greige-Gerges, S. Fourmentin, Basics and properties of deep eutectic solvents: a review, *Environ Chem Lett* 19 (2021) 3397–3408. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01225-8>.
- [49] T.C. Pereira, V.P. Souza, A.P.F. Padilha, F.A. Duarte, E.M. Flores, Trends and perspectives on the ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds using natural deep

- eutectic solvents, *Current Opinion in Chemical Engineering* 47 (2025) 101088. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2024.101088>.
- [50] H. Aktaş, M.A. Kurek, Deep eutectic solvents for the extraction of polyphenols from food plants, *Food Chemistry* 444 (2024) 138629. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.138629>.
- [51] A. Khalid, S. Tahir, A.R. Khalid, M.A. Hanif, Q. Abbas, M. Zahid, Breaking new grounds: metal salts based-deep eutectic solvents and their applications- a comprehensive review, *Green Chem.* 26 (2024) 2421–2453. <https://doi.org/10.1039/D3GC04112C>.
- [52] C. Ferreira, M. Sarraguça, A Comprehensive Review on Deep Eutectic Solvents and Its Use to Extract Bioactive Compounds of Pharmaceutical Interest, *Pharmaceuticals* 17 (2024) 124. <https://doi.org/10.3390/ph17010124>.
- [53] Z. Yang, Natural Deep Eutectic Solvents and Their Applications in Biotechnology, in: T. Itoh, Y.-M. Koo (Eds.), *Application of Ionic Liquids in Biotechnology*, Springer International Publishing, Cham, 2018: pp. 31–59. [https://doi.org/10.1007/10\\_2018\\_67](https://doi.org/10.1007/10_2018_67).
- [54] F.S. Bragagnolo, M.M. Strieder, R.S. Pizani, L.M. De Souza Mesquita, M. González-Miquel, M.A. Rostagno, Revisiting natural deep eutectic solvents (NADES) as extraction media and ready-to-use purposes, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 175 (2024) 117726. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117726>.
- [55] B. Socas-Rodríguez, M.V. Torres-Cornejo, G. Álvarez-Rivera, J.A. Mendiola, Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Bioactive Compounds from Natural Sources and Agricultural By-Products, *Applied Sciences* 11 (2021) 4897. <https://doi.org/10.3390/app11114897>.
- [56] A.R.C. Duarte, A.S.D. Ferreira, S. Barreiros, E. Cabrita, R.L. Reis, A. Paiva, A comparison between pure active pharmaceutical ingredients and therapeutic deep eutectic solvents: Solubility and permeability studies, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 114 (2017) 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.02.003>.
- [57] I.M. Aroso, J.C. Silva, F. Mano, A.S.D. Ferreira, M. Dionísio, I. Sá-Nogueira, S. Barreiros, R.L. Reis, A. Paiva, A.R.C. Duarte, Dissolution enhancement of active pharmaceutical ingredients by therapeutic deep eutectic systems, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 98 (2016) 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.11.002>.
- [58] M. Saha, M.S. Rahman, M.N. Hossain, D.E. Raynie, M.A. Halim, Molecular and Spectroscopic Insights of a Choline Chloride Based Therapeutic Deep Eutectic Solvent, *J. Phys. Chem. A* 124 (2020) 4690–4699. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.0c00851>.
- [59] E. Silva, F. Oliveira, J.M. Silva, R.L. Reis, A.R.C. Duarte, Untangling the bioactive properties of therapeutic deep eutectic solvents based on natural terpenes, *Current Research in Chemical Biology* 1 (2021) 100003. <https://doi.org/10.1016/j.crchbi.2021.100003>.
- [60] M. Devi, R. Moral, S. Thakuria, A. Mitra, S. Paul, Hydrophobic Deep Eutectic Solvents as Greener Substitutes for Conventional Extraction Media: Examples and Techniques, *ACS Omega* 8 (2023) 9702–9728. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07684>.
- [61] M.H. Zainal-Abidin, M. Hayyan, W.F. Wong, Hydrophobic deep eutectic solvents: Current progress and future directions, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 97 (2021) 142–162. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.03.011>.
- [62] L. Sportiello, F. Favati, N. Condelli, M. Di Cairano, M.C. Caruso, B. Simonato, R. Tolve, F. Galgano, Hydrophobic deep eutectic solvents in the food sector: Focus on their use for the extraction of bioactive compounds, *Food Chemistry* 405 (2023) 134703. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134703>.

- [63] X. Zheng, F. Yin, G. Gong, X. Zhang, S. He, W. Tang, X.-H. Wei, An overview of hydrophobic deep eutectic solvents driven liquid-phase extraction: Applications and prospects, *Journal of Chromatography A* 1748 (2025) 465824. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.465824>.
- [64] O.V. Morozova, I.S. Vasil'eva, G.P. Shumakovich, E.A. Zaitseva, A.I. Yaropolov, Deep Eutectic Solvents for Biotechnology Applications, *Biochemistry Moscow* 88 (2023) S150–S175. <https://doi.org/10.1134/S0006297923140092>.
- [65] I. Bashir, A.H. Dar, K.K. Dash, V.K. Pandey, U. Fayaz, R. Shams, S. Srivastava, R. Singh, Deep eutectic solvents for extraction of functional components from plant-based products: A promising approach, *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 33 (2023) 101102. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101102>.
- [66] F.M. Perna, P. Vitale, V. Capriati, Deep eutectic solvents and their applications as green solvents, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 21 (2020) 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.09.004>.
- [67] R. Castro-Muñoz, A. Can Karaça, M. Saeed Kharazmi, G. Boczkaj, F.J. Hernández-Pinto, S. Anusha Siddiqui, S.M. Jafari, Deep eutectic solvents for the food industry: extraction, processing, analysis, and packaging applications – a review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 64 (2024) 10970–10986. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2230500>.
- [68] Á. Santana-Mayor, R. Rodríguez-Ramos, A.V. Herrera-Herrera, B. Socas-Rodríguez, M.Á. Rodríguez-Delgado, Deep eutectic solvents. The new generation of green solvents in analytical chemistry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 134 (2021) 116108. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116108>.
- [69] B.B. Hansen, S. Spittle, B. Chen, D. Poe, Y. Zhang, J.M. Klein, A. Horton, L. Adhikari, T. Zelovich, B.W. Doherty, B. Gurkan, E.J. Maginn, A. Ragauskas, M. Dadmun, T.A. Zawodzinski, G.A. Baker, M.E. Tuckerman, R.F. Savinell, J.R. Sangoro, Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications, *Chem. Rev.* 121 (2021) 1232–1285. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00385>.
- [70] Y. Dai, J. van Spronsen, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Natural Deep Eutectic Solvents as new potential media for green technology, (n.d.).
- [71] T. Negi, A. Kumar, S.K. Sharma, N. Rawat, D. Saini, R. Sirohi, O. Prakash, A. Dubey, A. Dutta, N.C. Shahi, Deep eutectic solvents: Preparation, properties, and food applications, *Heliyon* 10 (2024) e28784. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e28784>.
- [72] A. Kovács, E.C. Neyts, I. Cornet, M. Wijnants, P. Billen, Modeling the Physicochemical Properties of Natural Deep Eutectic Solvents, *ChemSusChem* 13 (2020) 3789–3804. <https://doi.org/10.1002/cssc.202000286>.
- [73] A. García, E. Rodríguez-Juan, G. Rodríguez-Gutiérrez, J.J. Rios, J. Fernández-Bolaños, Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESs), *Food Chemistry* 197 (2016) 554–561. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.131>.
- [74] B. Ozturk, C. Parkinson, M. Gonzalez-Miquel, Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents, *Separation and Purification Technology* 206 (2018) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.05.052>.
- [75] S. Kaoui, B. Chebli, S. Zaidouni, K. Basaid, Y. Mir, Deep eutectic solvents as sustainable extraction media for plants and food samples: A review, *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 31 (2023) 100937. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100937>.

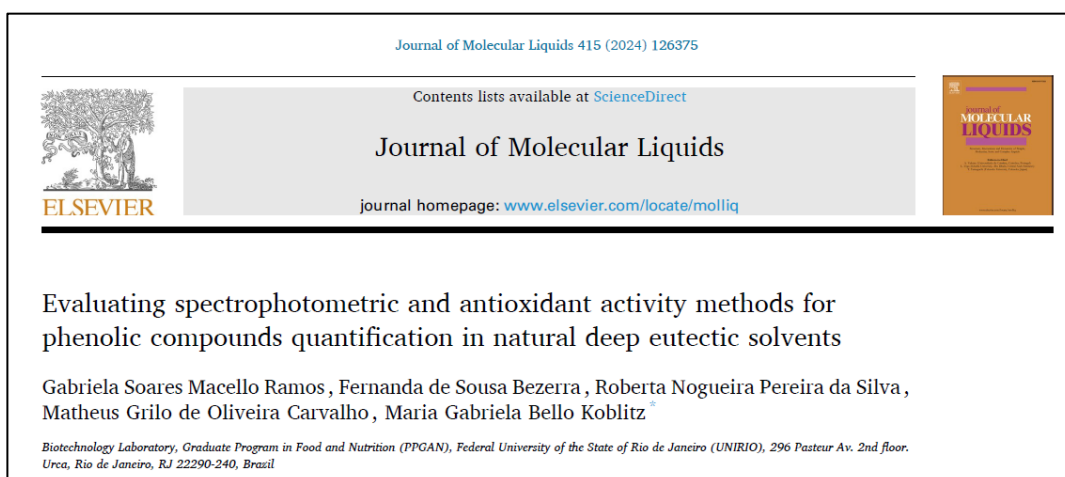
- [76] K. Mamtani, K. Shahbaz, M.M. Farid, Deep eutectic solvents – Versatile chemicals in biodiesel production, *Fuel* 295 (2021) 120604. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.120604>.
- [77] S.M. Taklimi, A. Divsalar, B. Ghalandari, X. Ding, M.L. Di Gioia, K.A. Omar, A.A. Saboury, Effects of deep eutectic solvents on the activity and stability of enzymes, *Journal of Molecular Liquids* 377 (2023) 121562. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.121562>.
- [78] D. Armodo, E. Maffei, F. Marra, S. Nejrotti, C. Prandi, Combination of Enzymes and Deep Eutectic Solvents as Powerful Toolbox for Organic Synthesis, *Molecules* 28 (2023) 516. <https://doi.org/10.3390/molecules28020516>.
- [79] M. Pätzold, S. Siebenhaller, S. Kara, A. Liese, C. Syldatk, D. Holtmann, Deep Eutectic Solvents as Efficient Solvents in Biocatalysis, *Trends in Biotechnology* 37 (2019) 943–959. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.03.007>.
- [80] A. Fernández, M.A. Longo, F.J. Deive, M.S. Álvarez, A. Rodríguez, Dual role of a natural deep eutectic solvent as lipase extractant and transesterification enhancer, *Journal of Cleaner Production* 346 (2022) 131095. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131095>.
- [81] J.T. Gorke, F. Sreinc, R.J. Kazlauskas, Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents, *Chem. Commun.* (2008) 1235. <https://doi.org/10.1039/b716317g>.
- [82] C.E. Paul, V. Gotor-Fernández, Applied biocatalysis in deep eutectic solvents, in: *Biocatalysis in Green Solvents*, Elsevier, 2022: pp. 467–510. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91306-5.00011-X>.
- [83] B. Nian, X. Li, Can deep eutectic solvents be the best alternatives to ionic liquids and organic solvents: A perspective in enzyme catalytic reactions, *International Journal of Biological Macromolecules* 217 (2022) 255–269. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.044>.
- [84] J.A. Kist, H. Zhao, K.R. Mitchell-Koch, G.A. Baker, The study and application of biomolecules in deep eutectic solvents, *J. Mater. Chem. B* 9 (2021) 536–566. <https://doi.org/10.1039/D0TB01656J>.
- [85] T. Itoh, Enzymatic Reactions using Ionic Liquids for Green Sustainable Chemical Process; Stabilization and Activation of Lipases, *The Chemical Record* 23 (2023) e202200275. <https://doi.org/10.1002/tcr.202200275>.
- [86] N. Zhang, P. Domínguez De María, S. Kara, Biocatalysis for the Synthesis of Active Pharmaceutical Ingredients in Deep Eutectic Solvents: State-of-the-Art and Prospects, *Catalysts* 14 (2024) 84. <https://doi.org/10.3390/catal14010084>.
- [87] C. Cannavacciuolo, S. Pagliari, J. Frigerio, C.M. Giustra, M. Labra, L. Campone, Natural Deep Eutectic Solvents (NADESs) Combined with Sustainable Extraction Techniques: A Review of the Green Chemistry Approach in Food Analysis, *Foods* 12 (2022) 56. <https://doi.org/10.3390/foods12010056>.
- [88] D. Granato, J.S. Santos, L.G. Maciel, D.S. Nunes, Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 80 (2016) 266–279. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.010>.
- [89] C. Fanali, S. Della Posta, L. Dugo, A. Gentili, L. Mondello, L. De Gara, Choline-chloride and betaine-based deep eutectic solvents for green extraction of nutraceutical compounds from spent coffee ground, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 189 (2020) 113421. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113421>.

- [90] I. Zardo, A. De Espíndola Sobczyk, L.D.F. Marczak, J. Sarkis, Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Sunflower Seed Cake Using Response Surface Methodology, *Waste Biomass Valor* 10 (2019) 33–44. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0038-3>.
- [91] S. Albe Slabi, C. Mathe, M. Basselin, X. Framboisier, M. Ndiaye, O. Galet, R. Kapel, Multi-objective optimization of solid/liquid extraction of total sunflower proteins from cold press meal, *Food Chemistry* 317 (2020) 126423. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126423>.
- [92] I.V. Pires, Y.C.N. Sakurai, N.R. Ferreira, S.G.C. Moreira, A.M. Da Cruz Rodrigues, L.H.M. Da Silva, Elaboration and Characterization of Natural Deep Eutectic Solvents (NADESs): Application in the Extraction of Phenolic Compounds from pitaya, *Molecules* 27 (2022) 8310. <https://doi.org/10.3390/molecules27238310>.
- [93] J.L.K. Mamilla, U. Novak, M. Grilc, B. Likozar, Natural deep eutectic solvents (DES) for fractionation of waste lignocellulosic biomass and its cascade conversion to value-added bio-based chemicals, *Biomass and Bioenergy* 120 (2019) 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.12.002>.
- [94] M. Martinović, N. Krgović, I. Nešić, A. Žugić, V.M. Tadić, Conventional vs. Green Extraction Using Natural Deep Eutectic Solvents—Differences in the Composition of Soluble Unbound Phenolic Compounds and Antioxidant Activity, *Antioxidants* 11 (2022) 2295. <https://doi.org/10.3390/antiox11112295>.
- [95] S. Chanioti, C. Tzia, Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques, *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 48 (2018) 228–239. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.07.001>.
- [96] K. Radošević, N. Ćurko, V. Gaurina Srček, M. Cvjetko Bubalo, M. Tomašević, K. Kovačević Ganić, I. Radojčić Redovniković, Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity, *LWT* 73 (2016) 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.037>.
- [97] B. Socas-Rodríguez, Á. Santana-Mayor, A.V. Herrera-Herrera, M.Á. Rodríguez-Delgado, Deep eutectic solvents, in: *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science*, Elsevier, 2020: pp. 123–177. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817386-2.00005-6>.
- [98] S. Nieto, F. Martínez-Mora, I. Lozano, F.J. Ruiz, R. Villa, P. Lozano, New sustainable biocatalytic approach for producing lipophilic (hydroxy)cinnamic esters based on deep eutectic mixtures, *Catalysis Today* 431 (2024) 114500. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2023.114500>.
- [99] C. Ortega-Zamora, J. González-Sálamo, J. Hernández-Borges, Deep Eutectic Solvents Application in Food Analysis, *Molecules* 26 (2021) 6846. <https://doi.org/10.3390/molecules26226846>.
- [100] F.G. Calvo-Flores, C. Mingorance-Sánchez, Deep Eutectic Solvents and Multicomponent Reactions: Two Convergent Items to Green Chemistry Strategies, *ChemistryOpen* 10 (2021) 815–829. <https://doi.org/10.1002/open.202100137>.



# Capítulo 2

## Evaluating spectrophotometric and antioxidant activity methods for phenolic compounds quantification in natural deep eutectic solvents



## Abstract

Natural deep eutectic solvents (NaDES) are a new generation of sustainable solvents with unique physicochemical properties derived from their natural composition. This study addressed the accuracy of spectrophotometric analytical methods in quantifying phenolic compounds, namely chlorogenic acid, in NaDES, both as a standard and as part of more complex natural extracts. Comparative analyses of different quantification methods were conducted, using HPLC as the reference, revealing the influence of solvent components on the accuracy of results. Pearson's correlation was evaluated between the colorimetric and chromatographic methods through the comparison of standard curves. The Folin-Ciocalteu reagent method was highlighted as the most correlated with the reference method in NaDES composed of lactic acid, while the Fast Blue BB method was noted for NaDES composed of glycerol, both with Pearson's R values greater than 0.99. Variations in pH and solvent composition affected the sensitivity of the spectrophotometric methods, requiring a customized approach for each solvent. However, when spectrophotometric methods were applied to sunflower meal extracts, none, not even when antioxidant activity evaluation methods were used, was able to replicate the order of extraction efficiency revealed by the HPLC analysis, namely: AL:G > EtOH > CC:GL > U:GL > B:AL. The best results were achieved – correctly identifying the two best extraction solvents – when a solvent-directed method was used to analyze each extract, which resulted in extracts containing 3,075.78  $\mu\text{g CGA mL}^{-1}$  AL:G and 2,384.83  $\mu\text{g CGA mL}^{-1}$  EtOH, but also 2,002.67  $\mu\text{g CGA mL}^{-1}$  B:AL; 1,488.68  $\mu\text{g CGA mL}^{-1}$  U:GL and 579,14  $\mu\text{g CGA mL}^{-1}$  CC:GL. This study contributed to a more comprehensive understanding of the challenges associated with the spectrophotometric analysis of phenolic compounds in NaDES, highlighting the need to select the right analytical method for each different solvent formulation.

**Keywords:** quantification; HPLC; sunflower meal; Folin-Ciocalteu; Prussian blue; Fast Blue BB, antioxidant activity

## Introduction

Deep eutectic solvents (DES) are a new generation of sustainable solvents made by mixing two or more high melting point components, where one is a hydrogen donor and the other is an acceptor, strongly associated through hydrogen bonds. The resulting eutectic mixture has a much lower melting point than any of the individual components and remains liquid at room and lower temperatures [1–3]. Natural deep eutectic solvents (NaDES) are an extension of DES, formulated

exclusively from natural components, usually primary metabolites such as sugars, alcohols, amino acids, organic acids, and natural quaternary ammonium salts [4]. The synergistic interaction among the components of DES creates an environment conducive not only to the dissolution of substances across a wide range of polarity, but also to the expression of antioxidant activity [5]. The physicochemical properties of NaDES are influenced by their hydrogen acceptors and donors, allowing customization for specific applications through composition and/or molar ratio adjustments [1,6]. Additionally, NaDES's low volatility, non-flammability, reduced vapor pressure, chemical and thermal stability, biodegradability, and non-toxicity have garnered increasing interest [7]. Moreover, according to Bezerra et al. [4] and González et al. [9] natural deep eutectic solvents (NADES) have shown great potential in the extraction of both polar and non-polar biologically important phytochemicals such as alkaloids, carotenoids, and phenolics (anthocyanins, isoflavonoids, and curcuminoids). These solvents offer a promising alternative to conventional extraction methods, as they are capable of isolating a wide range of bioactive compounds with high efficiency and reduced environmental impact. The properties of DES, however, appear to significantly hinder the quantification of phenolic compounds in these solvents, especially when applying spectrophotometric methods, which are known to be susceptible to various interferences [9].

According to Granato et al. [10] the three most applied UV/VIS spectrophotometric methods to quantify phenolic compounds are the Folin-Ciocalteu, the Prussian Blue and the Fast Blue assays. Of those, however, only the former has been commonly applied to DES or NaDES media [9,11]. Total phenolic content assays, like the two first above-mentioned, are based on the reduction capacity of phenolic compounds and may, as such, be likened to methods used to evaluate the antioxidant activity. The reducing activity is just one of many forms of antioxidant activity, which may be exerted by phenolic compounds and detected by different spectrophotometric methods, and which have already been successfully applied in NaDES media [8,12,13]. Thus, the DPPH, ABTS, FRAP and ORAC methods may also be applied to detect the presence and quantify phenolic compounds in NaDES.

The aim of this study was to thoroughly compare three different spectrophotometric methods commonly used for the quantification of phenolic compounds, using the HPLC as the reference method. Chlorogenic acid (5-CGA) was therefore used as the standard, and four different NaDES formulations as well as a 40% hydroethanolic solution were used as solvents. Furthermore, sunflower meal extracts, rich in CGA, were also evaluated. The ultimate goal was to highlight the various hurdles characteristic of the spectrophotometric methods and contribute to understanding the challenges associated with quantifying phenolic compounds in NaDES.

## Materials and methods

### Materials

#### Reagents

NaDES were prepared based on the works of Dai et al. [14] and Zdanowicz [15], using lactic acid 85%, betaine 98%, choline chloride 98%, glycerol analytical grade (A.G.), glucose (A.G.) and urea 99%. The spectrophotometric quantification methods used sodium carbonate, ferric chloride, potassium ferricyanide, sodium hydroxide (A.G.), as well as the Folin-Ciocalteu reagent and the Fast Blue BB salt. For chromatographic analyses, HPLC-grade formic acid, acetonitrile, and methanol were used. In all analyses, chlorogenic acid (1,4,5-trihydroxycyclohexanecarboxylic acid 3-(3,4-dihydroxycinnamate)) with a purity level of  $\geq 95\%$  (Sigma-Aldrich, Brazil) was used as the standard.

#### Plant material

Sunflower meal was provided by the Caramuru company (Itumbiara – GO, Brazil), degreased, desolventized, dried, and pelletized. This material was stored in polyethylene bags under refrigeration ( $8 \pm 2^\circ\text{C}$ ) until use.

### Methods

#### Solvents and standard solutions

NaDES components were mixed by magnetic stirring at  $50^\circ\text{C}$  until a transparent homogeneous liquid was formed. The solvents were diluted with ultrapure water (Milli-Q direct 8, Merck) to achieve 30 g H<sub>2</sub>O per 100 g of solvent [16]. The composition and characteristics of the solvents obtained are shown in Table 1. Standard curves ranging from 0.4 to 16  $\mu\text{g CGA}\cdot\text{mL}^{-1}$  were prepared for chromatographic analyses and from 15 to 800  $\mu\text{g CGA}\cdot\text{mL}^{-1}$  for spectrophotometric analyses, using all the solvents described in Table 1. For the characterization of the solvents the pH was measured using a benchtop pH meter (Biovera, PB 1800, São Paulo, Brazil), the water activity was determined with the PawKit device (Decagon, Aqualab, Washington, EUA). The viscosity was assessed using a rheometer (Anton Paar, MCR 72, Austria). Additionally, the density was calculated using the formula  $m/v$  using a glass pycnometer of 30 mL and a digital analytical balance (Shimadzu, AUY220, Barueri, Brazil).

Table 1. Solvents composition and characteristics

Acronym	HBA <sup>1</sup>	HBD <sup>2</sup>	Molar ratio	pH	Water activity	Density (g.mL <sup>-1</sup> )	Viscosity (mPa.s)
AL:G	Lactic Acid	Glucose	5:1	0.73	0.68	1.22	74.5
B:AL	Betaine	Lactic Acid	1:2	3.00	0.58	1.17	60.6
CC:GL	Choline Chloride	Glycerol	1:1	6.35	0.08	1.14	49.5
U:GL	Urea	Glycerol	1:1	8.82	0.38	1.21	24.1
EtOH	Ethanol in water		40% <sup>3</sup>	5.54	0.92	0.93	3.2

<sup>1</sup> Hydrogen bond acceptor; <sup>2</sup> Hydrogen bond donor; <sup>3</sup> (w/w)

### Sunflower meal extracts

The mass of 4.5 g of sunflower meal was weighed and added to 15 mL of 40% ethanol (control) or NaDES. All samples were heated under magnetic stirring at 45°C for 15 minutes and then sonicated using an ultrasound probe device (Ecosonics, QR500, Indaiatuba, Brazil) for 1 minute (500 W/cm<sup>2</sup>; 20 kHz) in an ice bath. After extraction, the extracts were filtered through a polyester cloth and stored at -80°C in an ultra-freezer until analysis [4].

### Analytical methods

#### High performance liquid chromatography

Sample preparation was performed as follows: samples were diluted (1:25) with the initial mobile phase and filtered through a hydrophilic PTFE filter (13 mm diameter and 0.22 µm pore size) to 2 mL clear glass vials, capped with PTFE/silicone septum caps, and were inserted directly to the automatic injection module of the equipment. A high-performance liquid chromatograph with a photodiode array (PDA) detector and column oven at 40°C (Perkin Elmer, Flexar, Connecticut, USA), equipped with a reversed phase column (100-5-C18 4.6 × 250 mm - Kromasil), was used. The injection volume was 20 µL and the flow rate was 0.8 mL/min. The mobile phases were: 0.3% formic acid in H<sub>2</sub>O (A); 100% methanol (B); 100% acetonitrile (C). The elution gradient was: 0.1 min, 85% A, 14.5% B and 0.5% C; 7 min, 55% A, 43.5% B and 1.5% C; 14 min, 5% A 93% B and 2% C; 20 min, 1% A, 97% B and 2% C; 23 min, 15% A, 83% B and 2% C; and 23-33 min, 85% A, 14.5% B and 0.5% C. A solution of ultrapure water: methanol (97:3, v/v) was used to dilute standards and samples. Analyses and injections were conducted in duplicate, with detection performed at 260, 280, and 320 nm. Identification was based on retention times, and quantification was based on a standard curve with concentrations ranging from 0.4 to 16 µg CGA.mL<sup>-1</sup>.

#### Spectrophotometric assays

Folin-Ciocalteu assay [11] - Aliquots of 50 µL were added with 3.95 mL of ultrapure water, 200 µL of Folin-Ciocalteu reagent, and 250 µL of sodium carbonate solution (20%). The mixture was

vortexed and kept in the dark for 2 hours. Aliquots were then transferred to a 96-well microplate and read at 765 nm (FlexStation III, Molecular Devices, California, USA - with Softmax PRO 5.4).

Prussian blue assay [17] - Aliquots of 200  $\mu\text{L}$  were added with 200  $\mu\text{L}$  of Fe III solution (2:1.5 v/v of 1.5 mM ferric chloride and 1.5 mM potassium ferricyanide). The mixture was vortexed and set aside for 10 minutes. Aliquots were then transferred to a 96-well microplate and read at 790 nm.

Fast Blue BB assay [10] - Aliquots of 200  $\mu\text{L}$  were added with 100  $\mu\text{L}$  of Fast Blue BB solution (0.1% w/v). The mixture was treated in an ultrasound bath for 30 seconds, then added with 100  $\mu\text{L}$  of 5% sodium hydroxide solution, and vortexed and set aside for 90 minutes. Aliquots were then transferred to a 96-well microplate and read at 420 nm.

Results are presented as the average of at least four replicates. The construction of the standard curves, equations and coefficients of determination ( $R^2$ ) was performed by linear regression.

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated using the different solvents. For the spectrophotometric assays (Supplementary Table 1), the calculation of LOD and LOQ was based on the standard deviation of the response and the slope, while for the chromatographic analysis (Supplementary Table 2), it was based on the signal-to-noise approach, as recommended by ICH [18] and INMETRO [19].

### **Antioxidant activity assays**

Four different assays were used to evaluate the antioxidant activity of the extracts. Results were expressed in Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchrome-2-carboxylic acid) equivalents ( $\mu\text{mol trolox.L}^{-1}$  extract), for comparison purposes.

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) [20] - Aliquots of 40  $\mu\text{L}$  were added with 560  $\mu\text{L}$  of DPPH solution (32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). The mixture was vortexed and kept in the dark for 30 minutes. Aliquots were then transferred to a 96-well microplate and read at 517 nm. The Trolox standard curve was prepared with concentrations up to 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

ABTS (2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazolin 6-sulfonic acid) [20]– Aliquots of 40  $\mu\text{L}$  were added with 560  $\mu\text{L}$  of the ABTS solution (initial absorbance between 0.8 and 1.0). The mixture was vortexed, transferred to a 96-well microplate, incubated at 37°C for 20 minutes, and read at 734 nm. The Trolox standard curve was prepared with concentrations up to 12  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

FRAP [21] – Aliquots of 20  $\mu\text{L}$  were added with 15  $\mu\text{L}$  of ultrapure water and 265  $\mu\text{L}$  of FRAP reagent (0.3 M sodium acetate solution, 10 mM TPTZ, and 20 mM ferric chloride) were added. The mixture was vortexed, transferred to a 96-well microplate, incubated at 37°C for 30 minutes, and read at 595 nm. The Trolox standard curve was prepared with concentrations up to 7.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

ORAC [22] - Aliquots of 80  $\mu\text{L}$  were added with 80  $\mu\text{L}$  of 78 nm fluorescein and 40  $\mu\text{L}$  of 221 nm AAPH (2,20-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) were added to a 96-well microplate. The kinetics of fluorescence decay (excitation: 485 nm, emission: 535 nm) were evaluated over 90 readings with 1-minute intervals. Antioxidant activity was evaluated by the area under the fluorescein decay curve. The Trolox standard curve was prepared with concentrations up to 120  $\mu\text{M}$ .

### **Statistical Analysis**

Pearson's correlation was applied, with a significance level of 95%, to compare each spectrophotometric assay with the HPLC analysis. Due to the difference in the concentration range used by the methods under comparison (0.4 to 16  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for the latter and 15 to 800  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for the former), an extrapolation was performed using the equation describing the behavior of the chromatographic method for each tested solvent. CGA quantification results obtained for the extracts were evaluated by analysis of variance (two-way ANOVA) with Tukey's post-test and a significance level of 99%.

## **Results**

### ***Calibration curves***

#### **High performance liquid chromatography - HPLC**

Figure 1 shows the curves obtained for CGA in the different tested solvents. The chromatograms can be observed in Supplementary Figures 1 to 6. The curves showed roughly similar behavior; however, from 2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  onwards, the curves presented varied sensitivity, i.e., different increases in peak area for the same increase in CGA concentration, represented by the value of  $a$  in the equation ( $y = ax + b$ ) [23]. Among the solvents, ethanol generated the highest sensitivity ( $a=91.551$ ) while CC:GL generated the lowest sensitivity ( $a=49.562$ ). The determination coefficients ranged between 1 and 0.9976, showing that a very high percentage of the variations in peak area were due solely to variations in the concentration of CGA. Despite the differences in sensitivity, the chromatographic method generated similar graphs for all tested solvents, which was not true for the spectrophotometric assays (Figs. 2, 3 and 4).

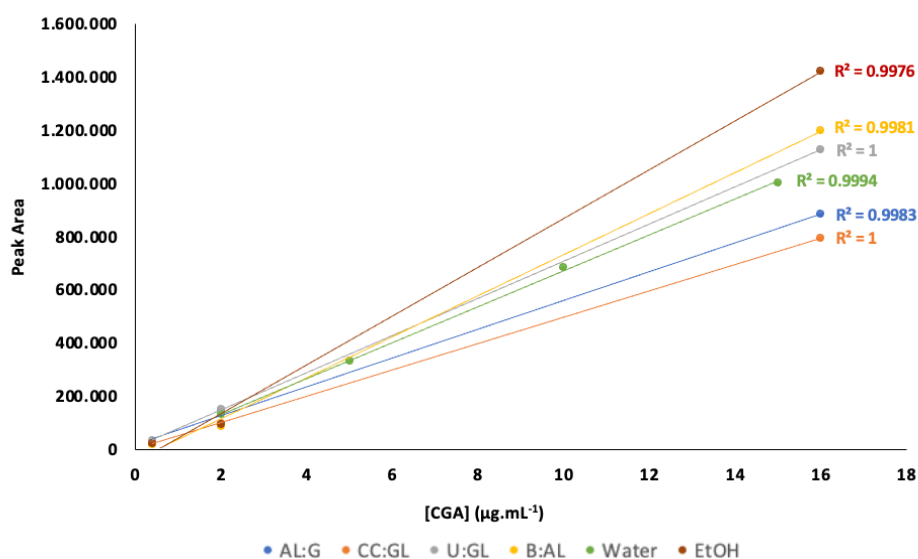


Figure 1. Curves and coefficients of determination obtained for chlorogenic acid in the different NaDES, in ethanol (40%), and in water by HPLC. Equations are presented in Supplementary Table 2.

## Spectrophotometric assays

### Folin-Ciocalteu assay

Figure 2 shows the curves generated by the colorimetric method using the Folin-Ciocalteu reagent at CGA concentrations ranging from 15 to 100 µg.mL<sup>-1</sup> (Fig. 2A) and from 100 to 800 µg.mL<sup>-1</sup> (Fig. 2B). This method showed high sensitivity for all tested solvents (a values ranging between 0.0003 and 0.0004 for all solvents) except CC:GL (aA=0.0001; aB=0.00005). Values for the coefficient of determination ranged between 0.6196 and 0.9997, showing that, for some solvents, almost 40% of the absorbance differences were due to factors other than changes in CGA concentration.

### Prussian blue assay

Figure 3 presents the curves generated using the Prussian blue colorimetric method at CGA concentrations ranging from 15 to 100 µg.mL<sup>-1</sup> (Fig. 3A) and from 100 to 800 µg.mL<sup>-1</sup> (Fig. 3B). For this method, CC:GL (aA=0.0003; aB=0.0002) and B:AL (aA =0.00005; aB =0.000003) showed low sensitivity, while AL:G (aA=0.0018; aB=0.0008) and U:GL (aA=0.0009; aB=0.0011) showed low sensitivity at low concentrations (aA), but better results at higher concentrations (aB). The opposite was observed for water (aA= 0.0104; aB= 0.0002), which showed high sensitivity at low concentrations and low sensitivity at high concentrations, despite the high absorbance. Values for the coefficients of determination ranged between 0.9954 and 0.9072, indicating that, for some



solvents, up to 10% of the variation could be attributed to factors other than the increase in CGA concentration.

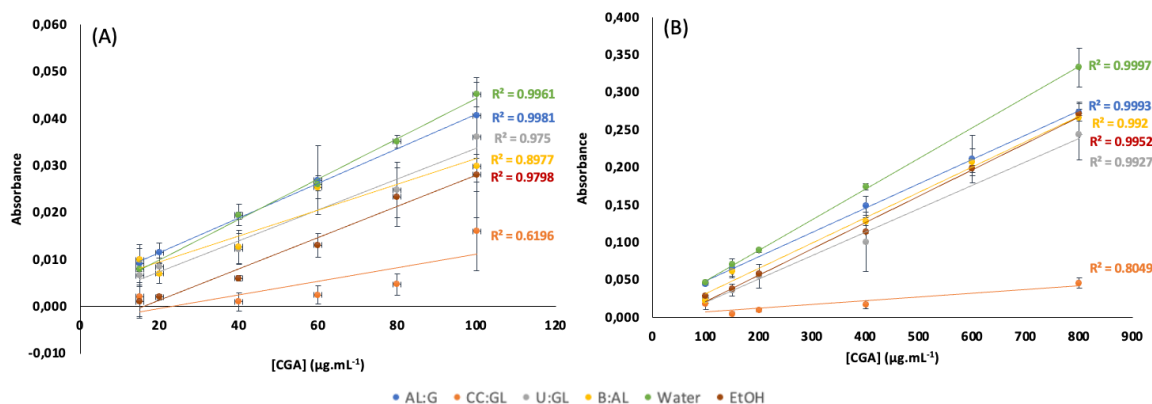


Figure 2. Curves and coefficients of determination obtained for chlorogenic acid in the different NaDES, in ethanol (40%), and in water by the Folin-Ciocalteu assay. (A) 15 to 100 µg.mL<sup>-1</sup>; (B) 100 to 800 µg.mL<sup>-1</sup>. Equations are presented in Supplementary Table 3.

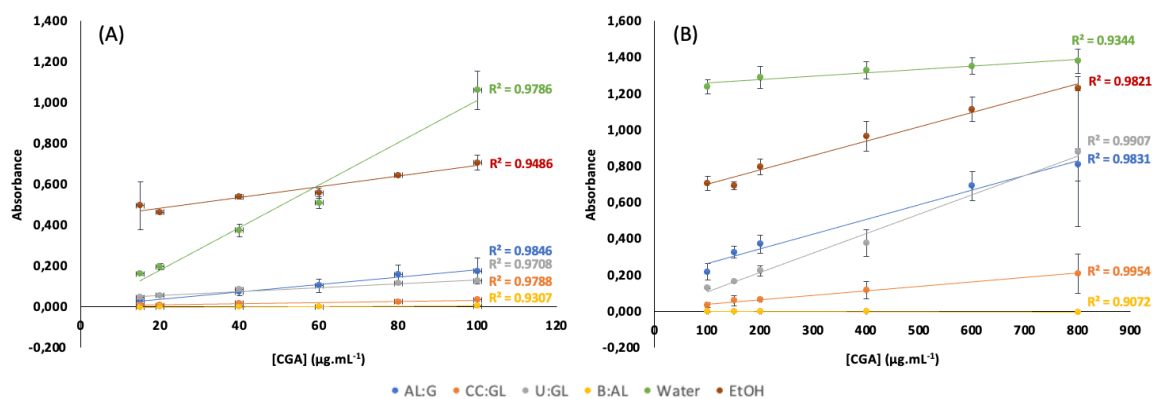


Figure 3. Curves and coefficients of determination obtained for chlorogenic acid in the different NaDES, in ethanol (40%), and in water by the Prussian blue assay. (A) 15 to 100 µg.mL<sup>-1</sup>; (B) 100 to 800 µg.mL<sup>-1</sup>. Equations are presented in Supplementary Table 4.

### Fast Blue

Figure 4 shows the curves generated by the colorimetric method using the Fast Blue BB salt in CGA concentrations ranging from 15 to 100 µg.mL<sup>-1</sup> (Fig. 3A) and from 100 to 800 µg.mL<sup>-1</sup> (Fig. 3B). This method showed high sensitivity for all solvents at low concentrations (ranging from 0.0013 to 0.0046); however, these values dropped significantly for all solvents, except CC:GL and U:GL, at the higher concentrations assessed. The coefficient of determination ranged from 0.9951 to 0.7988 at low concentrations but was 0.1559 for AL:G at concentrations greater than 100 µg.mL<sup>-1</sup>,

indicating low correlation between absorbance and the increase in CGA concentration in this solvent.

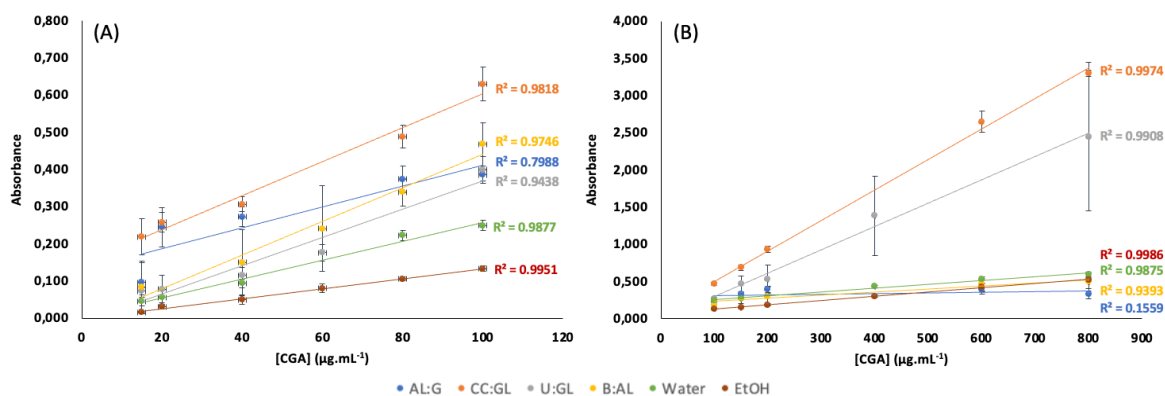


Figure 4. Curves and coefficients of determination obtained for chlorogenic acid in the different NaDES, in ethanol (40%), and in water by the Fast Blue BB assay. (A) 15 to 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (B) 100 to 800  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Equations are presented in Supplementary Table 5.

Although the evaluated methods are usually applied in different concentration ranges, the calculated theoretical LOD and LOQ values were roughly similar, within the same order of magnitude, for all methods. LOD ranged from 4.1  $\text{mg L}^{-1}$  (U:GL) to 6.3  $\text{mg L}^{-1}$  (water) for the chromatographic assay and from 0.4  $\text{mg L}^{-1}$  (water - Fast Blue) to 38.1  $\text{mg L}^{-1}$  (B:AL - Prussian Blue) among all the spectrophotometric assays and LOQ from 13.62  $\text{mg L}^{-1}$  (U:GL) to 21.77  $\text{mg L}^{-1}$  (ethanol) for the chromatographic assay and from 1.1  $\text{mg L}^{-1}$  (water - Prussian Blue) to 115.5  $\text{mg L}^{-1}$  (B:AL - Prussian Blue) among all the spectrophotometric assays (Supplementary Tables 1 and 2), which are in accordance with other data found in the literature [24]. It is interesting to note that all NaDES presented lower LOD and LOQ than water and ethanol for the HPLC assay and that the lowest LOD and LOQ of all were found for the Prussian Blue assay, when using water as the solvent.

### **Correlation between spectrophotometric and chromatographic quantification assays**

Pearson's correlation (R) was calculated for the results obtained by HPLC and each colorimetric assay, using each of the solvents. The results can be observed in Figure 5 as well as in Supplementary Table 6. As pointed out in section 2.2.4, for comparison to be possible, the concentration values used for HPLC were extrapolated based on the linear equation for each solvent. For all methods in all solvents, a significant correlation ( $p < 0.05$ ) with the theoretical values

obtained for the chromatographic analysis was verified. The only exception was the Fast Blue assay in AL:G solvent.

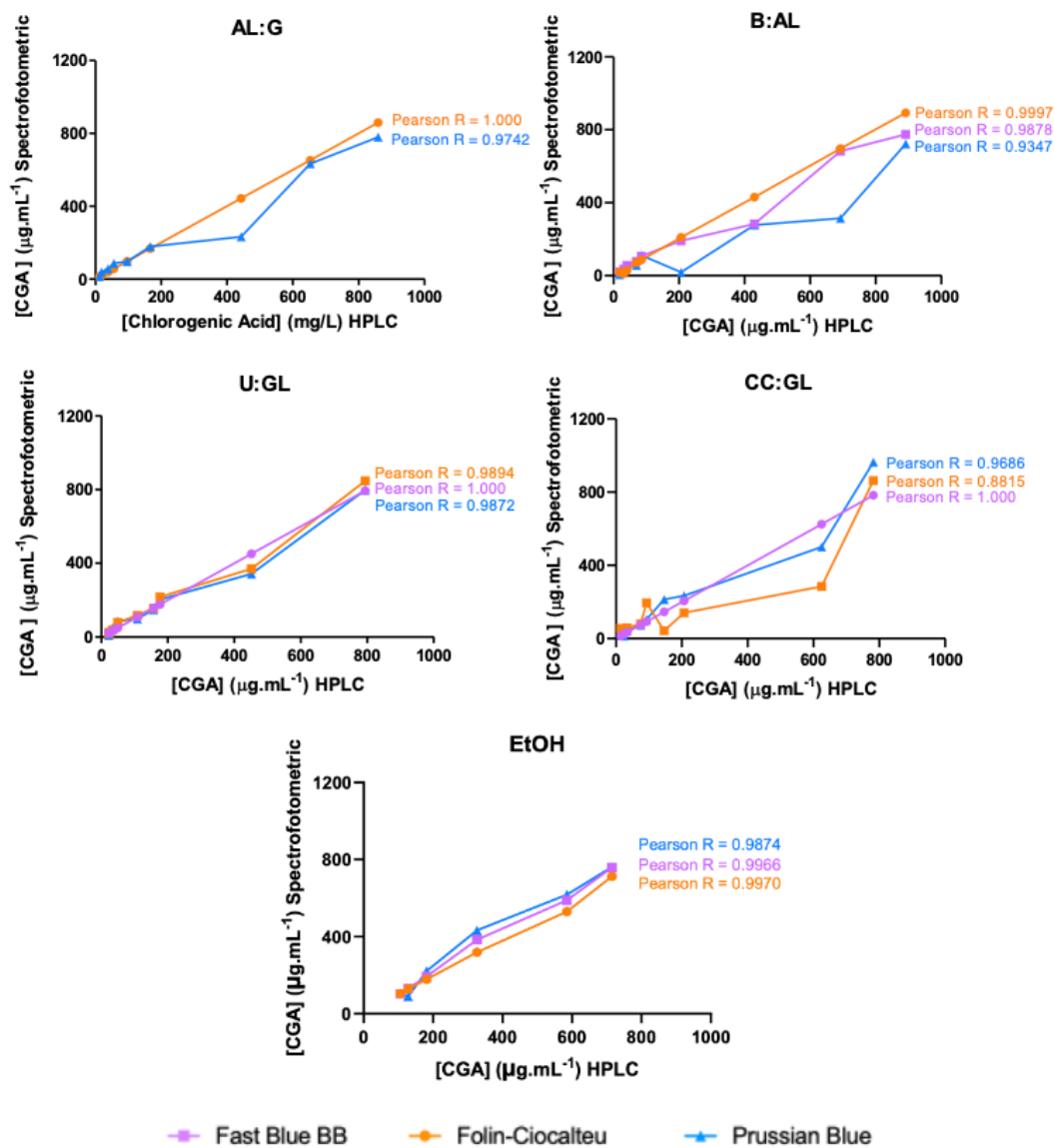


Figure 5. Graphs of Pearson's correlation between spectrophotometric quantification assays and HPLC.

The Folin-Ciocalteu assay presented Pearson's R values greater than 0.99 for 3 of the 5 tested solvents. The most noteworthy exception was the NaDES containing choline chloride. The correlation for this assay and the HPLC results was particularly high in NaDES containing lactic acid, with very acidic pH values. The assay with the Fast Blue salt also presented Pearson's R values greater than 0.99 for 3 of the 5 tested solvents, but the correlation between the results of this method and those obtained by HPLC was not significant for the NaDES formed by lactic acid

and glucose. The correlation was particularly high in NaDES containing glycerol, even in the presence of choline chloride. The assay using Prussian Blue did not present Pearson's R values greater than 0.99 for any of the tested solvents. In spite of that, this method proved not to be contraindicated for any of the solvent formulations, regardless of pH or the presence of choline chloride. Compared to the hydroethanolic solution, the different NaDES showed no noteworthy differences.

The former results were used to select the most suitable quantification assay for extracts in different solvents: Folin-Ciocalteu for NaDES extracts containing lactic acid (AL:G and B:AL) as well as ethanol, and Fast Blue BB for those containing glycerol (CC:GL and U:GL).

### Quantification of total phenolic compounds in sunflower meal extracts

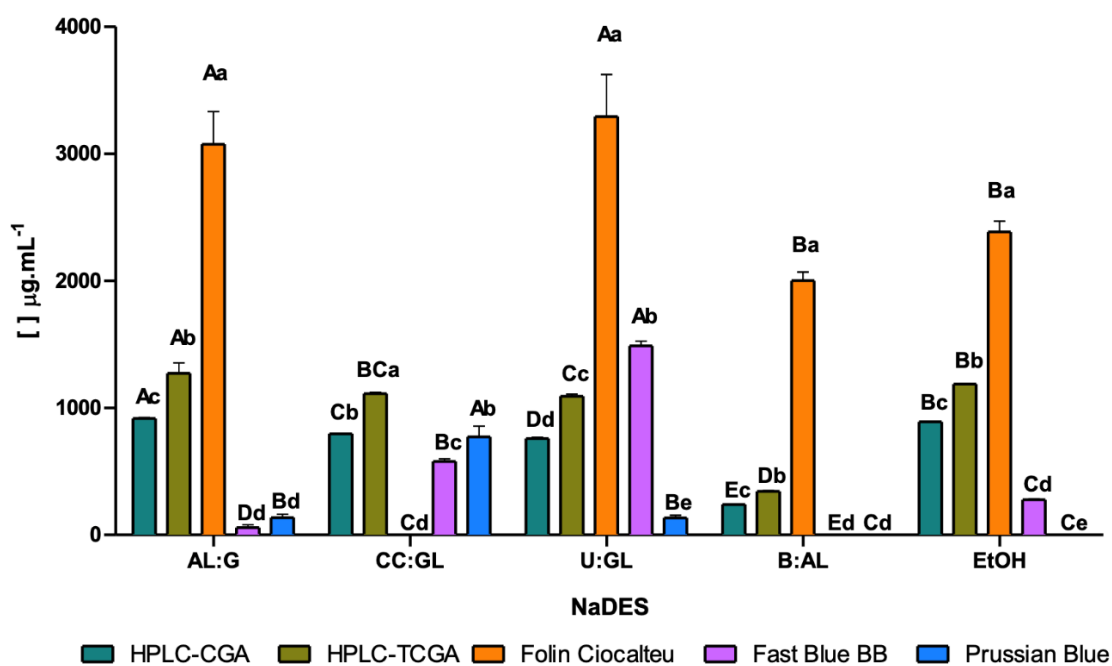


Figure 6. Quantification of total phenolic compounds in sunflower meal extracts by HPLC and different spectrophotometric assays.

Different capital letters indicate significant differences between different solvents in the same method. Different lowercase letters indicate significant differences between different methods in the same solvent. HPLC-CGA: quantification of chlorogenic acid by the HPLC method; HPLC-TCGA: quantification of total chlorogenic acids by the HPLC method.

In Figure 6 the results for the quantification of total phenolic compounds by different quantification methods in extracts obtained from sunflower meal with all the solvents are presented. HPLC-CGA refers to the quantification performed by HPLC considering the area of the 5-CGA peak. HPLC-TCGA refers to quantification from the same chromatograms (Supplementary Figures 7 to 11), considering the sum of the areas of all peaks observed at 320 nm, as all showed absorption spectrum compatible with compounds of the chlorogenic acid family. This sum was considered the content of total chlorogenic acids (TCGA) and used for comparison to the spectrophotometric analyses in an attempt to improve the concurrence of the results obtained by the different methods (chromatographic x spectrophotometric), since the spectrophotometric assays are much less selective than the chromatographic method. Quantification for spectrophotometric assays was conducted using the calibration curves prepared with CGA in each of the solvents, and the results refer to TCGA expressed in CGA equivalents.

Irrespective of the solvent used, the values obtained from HPLC-TCGA consistently exceeded those from HPLC-CGA, suggesting that all solvents facilitated extraction of additional compounds alongside CGA. CGA predominated among the extracted TCGA, aligning with literature indicating it constitutes approximately 70% of the phenolic compounds found in sunflower kernels and meal [25].

No spectrophotometric assay showed results similar to those obtained by HPLC-TCGA. The Folin-Ciocalteu assay overestimated the results in all tested solvents; the Prussian Blue assay underestimated the results in all solvents, and the Fast Blue BB assay underestimated the results in most solvents, except U:GL, where the results were overestimated.

According to the evaluation by HPLC-CGA and HPLC-TCGA, the extraction efficiency followed a decreasing order, namely: AL:G > EtOH > CC:GL > U:GL > B:AL. Taking the Folin-Ciocalteu assay into account, this order would be AL:G = U:GL > B:AL = EtOH. For the Fast Blue BB assay, the extraction order would be U:GL > CC:GL > EtOH > AL:G and for the Prussian Blue assay the order would be CC:GL > AL:G = U:GL. However, if quantification is considered by the most suitable assay for each solvent, as described in the former section, the decreasing order of TCGA concentration would be AL:G > EtOH > B:AL > U:GL > CC:GL.

No spectrophotometric quantification assay accurately determined the correct order of efficiency of the solvents for extracting phenolic compounds from sunflower meal, as revealed by the HPLC results. As an alternative spectrophotometric analysis strategy, the antioxidant activity of the extracts was evaluated using various assays, as illustrated in Figure 7.

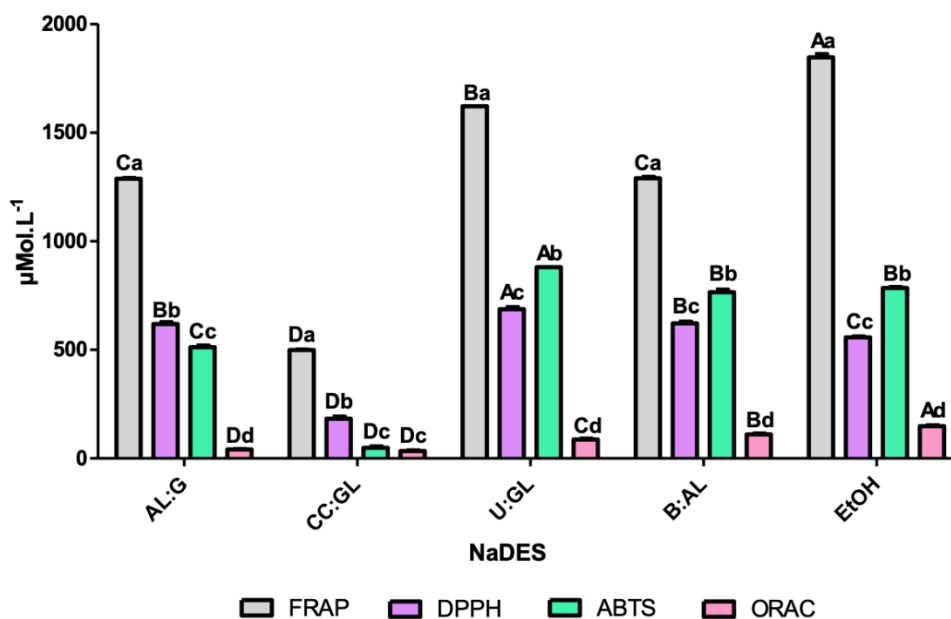


Figure 7. Antioxidant activity of sunflower meal extracts by different analytical assays. Results are presented in  $\mu\text{Mol Trolox.L}^{-1}$  extract.

Different capital letters indicate significant differences between solvents within the same method, while different lowercase letters indicate significant differences between methods within the same solvent.

### **Antioxidant activity**

The results for the antioxidant activity of the extracts with different solvents varied significantly, paralleling the variations observed in the TCGA quantification. Generally, results for FRAP were higher than for DPPH and ABTS, which were similar to each other and superior to ORAC results in all extracts. Here again, if the antioxidant activity results were used to determine the order of TCGA extraction efficiency from sunflower meal using different solvents, none of the methods would replicate the order indicated by the HPLC analyses.

To determine if the NaDES composition interfered with the antioxidant activity of the extracts, the antioxidant activity of pure NaDES was also evaluated and is shown in Table 2. Positive results indicated antioxidant activity, while negative values suggested pro-oxidant activity. Depending on the assay used, all solvents exhibited antioxidant (FRAP) or pro-oxidant (ABTS; ORAC) activity, while for the DPPH assay, some solvents functioned as antioxidants and others as pro-oxidants.

Table 2. Antioxidant activity ( $\mu\text{Mol trolox.L}^{-1}$  NaDES) of pure NaDES by different assays

Solvent	FRAP	DPPH	ABTS	ORAC
AL:G	$4.992 \pm 0.066^b$	$7.698 \pm 0.351^a$	$-6.927 \pm 0.044^a$	$-7.972 \pm 0.104^b$
CC:GL	$3.818 \pm 0.050^c$	$1.251 \pm 0.484^c$	$-11.555 \pm 1.319^b$	$-3.032 \pm 1.382^a$
U:GL	$4.079 \pm 0.100^c$	$-1.193 \pm 0.600^d$	$-6.978 \pm 0.488^a$	$-11.960 \pm 0.244^c$
B:AL	$4.035 \pm 0.090^c$	$4.061 \pm 0.200^b$	$-8.141 \pm 0.431^a$	$-1.714 \pm 0.209^a$
EtOH	$8.629 \pm 0.413^a$	$-1.867 \pm 0.033^d$	$-11.100 \pm 0.846^b$	$-11.004 \pm 0.677^c$

## Discussion

According to the literature review conducted by Bezerra and coworkers [4], DES have been widely used to extract bioactive compounds from plant materials, particularly the extraction of phenolic compounds, often achieving better results than conventional solvents. The NaDES formulations used in this study were selected based on the works of Fanali [26], Zdanowicz [15], and Bezerra et al.[8].

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is native to North America, cultivated annually and of significant importance to the global economy. Its seeds are a rich natural source of phenolic compounds, particularly caffeic acid, quinic acid, and chlorogenic acids, which together account for up to 70% of the total mass of these compounds. Thus, it was expected that sunflower meal extracts would show a somewhat simple phenolic profile and would function as an unchallenging natural extract for the present study. Moreover, the disposal of sunflower meal leads to the generation of approximately 15 million tons of this residue annually [4,27]. As chlorogenic acid and its isomers show various forms of bioactivity and considerable commercial appeal [28,29], the study of their eco-friendly extraction from a low-cost residue should also prove of economic interest.

Analysis of phenolic compounds by HPLC is considered precise and accurate, especially when compared to other quantification methods, such as spectrophotometric assays [10,30,31]. HPLC is regarded as the gold standard because it suffers the least influence from interferences [30]. Nevertheless, most studies that quantify phenolic compounds apply spectrophotometric assays, which are simpler and more affordable, given that they rely on lower installation and maintenance cost equipment and depend on less trained analysts. Additionally, these analytical methods require simpler sample preparation procedures and provide a global quantification of the phenolic compounds in the sample, as they are much less specific methods [10,32]. All the aforementioned relative advantages seem to overcome the difficulties faced by spectrophotometric assays, which mostly include the influence of different interferences and the very limited application to qualitative

assessments [31]. A large number of studies involving the quantification of total phenolic compounds in natural extracts have used these quantitative assays despite their limitations [10].

Analysis of phenolic compounds in NaDES, organic solvents, or aqueous media typically follows a similar approach: quantitative analyses are usually performed using spectrophotometric assays, while qualitative analyses rely on HPLC. For instance, Vorobyova et al. [33] quantified total phenolic compounds from tomato pomace using the Folin-Ciocalteu assay but evaluated the constituent phytochemicals using HPLC. The antioxidant activity of the NaDES extracts was quantified using spectrophotometric assays also widely used with other solvents: DPPH, ABTS, and FRAP. However, as is common in most NaDES studies, the methodology did not describe the use of standard curves in NaDES, nor did it mention the solvent's effect on quantification. A similar approach was used by Salamatullah et al. [34] for evaluating peppers, though in that case, only water and polar organic solvents were used.

### ***Calibration curves***

#### **HPLC**

In the present study, the consistent reproducibility of the results suggests that the HPLC method was a suitable tool for analyzing CGA in the evaluated solvents. However, a variation in peak area among the different solvents (NaDES, water, and ethanol) may indicate a possible matrix effect, underscoring the importance of performing calibration curves for each solvent. Such approach allows a more exact quantification of the target compound and more reliable standard for comparing the spectrophotometric assays evaluated in this study.

### ***Spectrophotometric assays***

#### **Folin-Ciocalteu assay**

The review by Granato et al. [10] pointed out three spectrophotometric methods for the quantification of total phenolic compounds, namely: using the Folin-Ciocalteu reagent, the Prussian blue, and the Fast Blue BB salt. However, most studies that quantified phenolic compounds extracted from food matrices applied the Folin-Ciocalteu reagent for these analyses [31]. This has also been the only one of the above-cited methods that has been applied to extracts in DES or NaDES, as may be observed in Dabetic et al. [35], Pires et al. [36] and Vorobyova et al. [33].

The Folin-Ciocalteu reagent consists of a mixture of phosphomolybdenum and phosphotungstic acids. The quantification of phenolic compounds is based on their ability to oxidize while reducing the reagent, through the transfer of electrons in an alkaline medium. This leads to the formation of a blue complex whose color intensity is proportional to the concentration of the reducing compounds [9,37,38]. According to Magalhães and coworkers [39], the detection limit for the Folin-



Ciocalteu assay is approximately  $0.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . However, Dabetić et al. [12] calculated a detection limit of  $1.341 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for this assay when applied to different deep eutectic solvents (choline chloride: citric acid and choline chloride: glucose). Therefore, the effectiveness of the assay at low phenolic concentrations may be affected by the solvent, and its detection limit will probably vary according to the composition of the NaDES. According to Margraf et al. [37], as the Folin-Ciocalteu assay is based on electron transfer, it measures the reducing capacity of the sample. Thus, all the compounds that act as reducers and are present in almost all plant related samples, besides mono- and di-hydroxylated phenolic compounds, such as thiols, amino acids, proteins, some vitamins, and inorganic ions, cause overestimation of the results and must be taken into consideration [9,10,32,38]

In the present study, the calibration curve for the Folin-Ciocalteu assay presented  $r^2 = 0.6196$  in the concentration range of 15 to  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and  $r^2 = 0.8049$  in the concentration range of 100 to  $800 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  when NaDES composed of CC was used. This also resulted in the lowest correlation to HPLC ( $R = 0.8815$ ), and the highest values for LOD ( $19.1 \text{ mg L}^{-1}$ ) and LOQ ( $57.7 \text{ mg L}^{-1}$ ) and may be attributed to the presence of choline chloride, which is known to react with the Folin-Ciocalteu reagent, forming an insoluble precipitate, as may be observed in Supplementary Figure 12. This precipitation possibly prevents the reagent from reacting with the phenolic compounds in the sample. Percevault and coworkers [9] also observed the occurrence of precipitation of the Folin-Ciocalteu reagent in NaDES containing choline chloride. This led those authors to conclude that these NaDES were incompatible with the Folin-Ciocalteu assay, which could be corroborated by the present study.

### **Prussian blue assay**

This assay involves a metal complexation reaction where  $\text{Fe}^{3+}$  is reduced to  $\text{Fe}^{2+}$  and ferric chloride ( $\text{FeCl}_3$ ) forms a complex with the phenolic compound, which then reacts with hexacyanoferrate (III) forming a blue complex  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ . The intensity of this blue color is proportional to the concentration of phenolic compounds in the sample [40,41]. According to Margraf et al.[37], the quantification capacity of the Prussian blue assay, even more so than of the Folin-Ciocalteu assay [10] is dependent on the redox potential and the reducing capacity of the different compounds, phenolic in nature or otherwise, present in the reaction medium or sample. For these authors, the alkaline pH used in the latter, tends to increase the reactivity of phenolic compounds, while the acidic pH of the former reduces it. However, in the work of Margraf et al [37], although ascorbic acid interfered with the final result, the presence of amino acids and reducing sugars did not appear to alter the result. Still according to the same authors, for the Prussian Blue

assay, the detection limit should be around  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , below the range used in the present study but similar to the calculated value obtained when water was used as solvent ( $\text{LOD} = 0.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). The calculated values for the other solvents were, however, much higher and ranged from  $1.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (AL:G) to  $38.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (B:AL). Even if the different solvents have changed this limit, it did not appear to have interfered with the quantification curves. To date, no studies have reported the use of the spectrophotometric assay with Prussian Blue in DES or NaDES.

Although it did not prove to be incompatible with any of the solvents assessed here, the Prussian blue reagent showed the lowest  $r^2$  value when used in B:AL. In the present study, lactic acid was used in one NaDES as a hydrogen acceptor (AL:G) and in another as a hydrogen donor (B:AL). When comparing the two NaDES, the sensitivity to the Prussian blue assay was significantly reduced, especially at the highest CGA concentrations, when betaine was used as a hydrogen acceptor instead of lactic acid, although both solvents showed similar acidic pH, density, and viscosity (Table 1). Betaine and choline chloride are both strong hydrogen acceptors due to the presence of a nitrogen atom in their structure, which may have generated competition in the Prussian Blue assay, interfering with the formation of the colored complex, even in the presence of reducing agents such as phenolic compounds. In the present study, this possible interference was perceived in the presence of betaine but not where choline chloride was used.

Once again, it is important to draw attention to the different behaviors of the curves for water and ethanol (Figure 2), two solvents commonly applied for the extraction of phenolic compounds, which reinforces the need to use specific calibration curves for each solvent used.

### ***Fast Blue BB***

The Fast Blue BB reaction is based on the coupling of phenolic compounds with diazonium salt in its ionized form, resulting in the formation of stable azo complexes. The nitrogen contained in the Fast Blue BB molecule joins the reactive activating group (-OH) of the phenolic compound, unless the position is already occupied, when the substitution occurs in the ortho position to the activating group. This process results in an electrophilic aromatic substitution, which occurs in an alkaline environment and generates phenoxide ions. The proposed interaction between the phenolic groups of chlorogenic acid and the diazonium fraction of Fast Blue BB indicated coupling in ortho positions [38,42]. Thus, unlike both assays previously discussed, this is not based on the reducing capacity of the analyzed compounds, but on their phenolic structure and consequent ability to form these complexes. As such, according to several authors, the Fast Blue BB method should surpass the usual interferents of the Folin-Ciocalteu assay [43–46]. The literature does not present data on possible interfering compounds for this assay.

For Fast Blue BB, the AL:G solvent presented unreliable calibration curves, with coefficients of determination of 0.7988 for lower concentrations (Fig.4A) and 0.1559 for higher concentrations (Fig.4B). According to Ravindranath et al.[46], the reaction between phenolic compounds and the Fast Blue salt must occur in an alkaline medium for stable complexes to be formed. Among the solvents in the present study, only U:GL showed alkaline pH, but high coefficients of determination were achieved for all solvents (except AL:G). This includes B:AL, which showed pH = 3.0. Nevertheless, all solvents with acidic pH (below 6.3), including ethanol, presented low sensitivity results at concentrations above 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . At low concentrations, pH does not appear to have been an obstacle, since the LOD for the more acidic solvents (AL:G = 1.8  $\text{mg L}^{-1}$  and B:AL = 1.9  $\text{mg L}^{-1}$ ) was lower than the value calculated for Ethanol (2.5  $\text{mg L}^{-1}$ ). However, pH may have been an improving factor, as the lowest LOD obtained for this assay was for the only alkaline solvent (U:GL = 0.9  $\text{mg L}^{-1}$ ).

### ***Quantification of total phenolic compounds in sunflower meal extracts***

Extracts obtained from natural compounds are necessarily much more complex than simple standard solutions [47]. Even extracts obtained from sunflower meal, composed mainly (up to 70%) by CGA isomers [25], should contain a variety of different phenolic and non-phenolic compounds that may interfere, positively or negatively, in the colorimetric reactions for the spectrophotometric quantification of TCGA. However, it is generally expected that these interferences will act in a proportional way, so that when two or more different solvents or extraction protocols are compared by the same analytical method, the interfering contaminants should be disregardable. This expected behavior was not confirmed by the experiments in the present study. While two of the three methods evaluated showed a consistent response to interferents in the samples, none of them led to the same conclusion as the standard method (HPLC). The Folin-Ciocalteu assay tended to generate overestimated results, possibly, and as expected, due to the presence of other reducing components in the extract [9,12]. However, these interferents most likely have come from the extract and not from the NaDES, since the results obtained in the samples containing NaDES rich in glucose (a reducing sugar) and NaDES rich in non-reducing glycerol were the same (Figure 6). The Prussian Blue assay tended to underestimate the results, possibly because of the acid pH that reduces polyphenol reactivity, as mentioned before [10]. Despite the observation by Magraf et al. [37] that the influence of amino acids was not significant for this assay, it is possible that this may explain the higher results found in CC:GL (Figure 6), the only NaDES that promoted considerable extraction of proteins from the sample (data not shown). The Fast Blue assay did not show consistent behavior in all tested solvents. In most of them, there was an underestimation of

the result. Possibly, the presence of many different compounds, whether phenolic or not, hindered the formation of the complex between the reagent and the phenolic rings in a reaction environment at a pH lower than that considered ideal for the reaction [38,42]. However, when the right pH conditions were provided (U:GL; pH = 8.82) [43–46] there was an overestimation of the CGA content compared to the HPLC results.

In principle, the Folin-Ciocalteu and Prussian blue assays, as they showed consistent positive and negative deviations, respectively, should generate reliable quantifications with disregardable error. Nevertheless, when the order of efficiency for the extraction solvents was judged by the different quantification assays, they did not coincide, exposing the deficiency of the spectrophotometric assays evaluated for this specific application. Coincidentally or not, the Folin-Ciocalteu assay was able to identify the most efficient extraction solvent compared to quantification by HPLC but was not able to correctly order the other extracts. Alternatively, when each extract was evaluated by the most suitable assay for its type of solvent, both the first and second most efficient solvents were correctly identified.

### ***Antioxidant activity***

Antioxidant activity assays are based on different processes; therefore, the same antioxidant compound or extract typically present different results for different evaluation methods. The method called ORAC monitors the antioxidant's ability to prevent the peroxy radical from attacking a fluorescent indicator. As this radical prevails in lipid peroxidation of foods and living systems, the method is widely considered to be an excellent measure of compounds' ability to yield a hydrogen atom. The FRAP assay measures the antioxidant's ability to donate electrons in an acidic medium. In this specific assay, this ability is evaluated by the reduction of  $\text{Fe}^{+3}$  to  $\text{Fe}^{+2}$  using TPTZ (tripirydyltriazine) or potassium ferricyanide, as in the Prussian Blue assay. Assays with ABTS or DPPH radicals are considered mixed methods, which involve both, the transfer of electrons and hydrogen atoms. In both cases, the assay starts with a known concentration of the stable radical, which is neutralized in the presence of the antioxidant in a concentration-dependent manner [48].

Phenolic compounds in general and CGA in particular exhibit antioxidant and reducing activity [49]; therefore, their quantification in solutions or extracts may be accurately evaluated by measuring the antioxidant activity in these media. Of the three colorimetric quantification assays assessed in this study, two are actually based exactly on the reducing capacity of phenolic compounds and are also considered methods for evaluating the antioxidant activity of compounds and/or extracts. Nevertheless, as occurred with the former colorimetric assays applied for TCGA quantification, the assays based on antioxidant activity were not able to estimate the concentration

of CGA and other phenolic compounds extracted by the different solvents and did not achieve the same order of extraction efficiency as the quantification performed by HPLC. Even assays based on the same principle (Prussian Blue and FRAP) showed inconsistent results with each other. Although the results for U:GL, AL:G, and B:AL were similar (if not in values, at least in the order of extractive capacity), the results for ethanol and CC:GL were opposite — ethanol was the best solvent and CC:GL the worst, according to the FRAP assay, while the opposite was observed for the Prussian Blue assay. Possibly, as in the other spectrophotometric assay, the interferences present in the extracts altered the response in an inconsistent manner, significantly altering the final result.

## Conclusion

The present study addressed the challenges involved in the quantification of phenolic compounds in NaDES by the spectrophotometric assays most used for this purpose. According to the results obtained, although the construction of standard curves using NaDES resulted in reliable quantifications and high correlation with HPLC, the presence of multiple compounds in natural extracts brought about interfering substances that significantly hindered reliable quantifications. As such, when a comparative assessment of the extractive capacity of NaDES was attempted, no spectrophotometric assay was able to generate the same results obtained by HPLC, casting doubt on the use of these methods in the comparative assessment of the extraction of phenolic compounds in NaDES media. As the colorimetric assays used to quantify TCGA, methods based on antioxidant activity were unable to accurately estimate the concentration of CGA and other phenolic compounds extracted by different solvents.

The most reliable results were obtained when each extract was evaluated by the most suitable colorimetric assays, as pointed out by the evaluation of standard curves. This pointed to the imperative need to select the most suitable method for each solvent. In this respect, the present study indicated that NaDES containing choline chloride should not be analyzed using the Folin-Ciocalteu assay, and NaDES with very acidic pH should not be evaluated by the Fast Blue assay. In turn, acidic NaDES may be well evaluated by the Folin-Ciocalteu assay, while, in the presence of choline chloride, the use of Prussian blue assay is indicated.

## Acknowledgment

The authors would like to thank the Caramuru company for providing the sunflower meal.

### **Author contributions: CRediT**

Gabriela Soares Macello Ramos - Formal analysis; Data curation; Writing - original draft; Fernanda de Sousa Bezerra - Formal analysis; Roberta Nogueira Pereira da Silva - Data curation; Matheus Grilo de Oliveira Carvalho - Formal analysis; Data curation, Maria Gabriela B. Koblitz – Conceptualization; Funding acquisition; Project administration; Supervision; Writing - review & editing.

### **Funding sources**

This work was supported by CAPES [grant number: 88882.431802/2019-01 and 88882.461727/2019-01]; FAPERJ [grant number: E-26/010.001686/2019 and E.26/202.182/2019]; CNPq [grant number: 142512/2020-6 and 372592/2022-8].

### **References**

- [1] T. El Achkar, H. Greige-Gerges, S. Fourmentin, Basics and properties of deep eutectic solvents: a review, *Environ Chem Lett* 19 (2021) 3397–3408. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01225-8>.
- [2] Á. Santana-Mayor, R. Rodríguez-Ramos, A.V. Herrera-Herrera, B. Socas-Rodríguez, M.Á. Rodríguez-Delgado, Deep eutectic solvents. The new generation of green solvents in analytical chemistry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 134 (2021) 116108. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116108>.
- [3] J.N. Al-Dawsari, A. Bessadok-Jemai, I. Wazeer, S. Mokraoui, M.A. AlMansour, M.K. Hadj-Kali, Fitting of experimental viscosity to temperature data for deep eutectic solvents, *Journal of Molecular Liquids* 310 (2020) 113127. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113127>.
- [4] F.D.S. Bezerra, D.F. Da Costa, M.G.B. Koblitz, Aproveitamento integral de matérias-primas oleaginosas com “solventes verdes”: revisão e oportunidades, *RSD* 9 (2020) e372985388. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i8.5388>.
- [5] M. Panić, K. Radošević, I. Radojčić Redovniković, K. Zagajski Kučan, A. Sander, J. Halambek, J. Prlić Kardum, A. Mitar, Physicochemical Properties, Cytotoxicity, and Antioxidative Activity of Natural Deep Eutectic Solvents Containing Organic Acid, *Chem. Biochem. Eng. q. (Online)* 33 (2019) 1–18. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2018.1454>.
- [6] K.A. Omar, R. Sadeghi, Physicochemical properties of deep eutectic solvents: A review, *Journal of Molecular Liquids* 360 (2022) 119524. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119524>.
- [7] F.M. Perna, P. Vitale, V. Capriati, Deep eutectic solvents and their applications as green solvents, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 21 (2020) 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.09.004>.
- [8] F.D.S. Bezerra, G.S.M. Ramos, M.G.D.O. Carvalho, M.G.B. Koblitz, Natural deep eutectic solvents characteristics determine their extracting and protective power on chlorogenic acids from

sunflower meal, *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 37 (2024) 101430. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2024.101430>.

[9] R.F. González-Laredo, V.I. Sayago-Monreal, M.R. Moreno-Jiménez, N.E. Rocha-Guzmán, J.A. Gallegos-Infante, L.F. Landeros-Macías, M. Rosales-Castro, Natural deep eutectic solvents ( NADES ) as an emerging technology for the valorisation of natural products and agro-food residues: a review, *Int J of Food Sci Tech* 58 (2023) 6660–6673. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16641>.

[10] L. Percevault, E. Limanton, P. Nicolas, L. Paquin, C. Lagrost, Electrochemical Determination and Antioxidant Capacity Modulation of Polyphenols in Deep Eutectic Solvents, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 9 (2021) 776–784. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c07023>.

[11] D. Granato, J.S. Santos, L.G. Maciel, D.S. Nunes, Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 80 (2016) 266–279. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.010>.

[12] S. Chanioti, C. Tzia, Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques, *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 48 (2018) 228–239. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.07.001>.

[13] N. Dabetić, V. Todorović, M. Panić, I. Radojčić Redovniković, S. Šobajjić, Impact of Deep Eutectic Solvents on Extraction of Polyphenols from Grape Seeds and Skin, *Applied Sciences* 10 (2020) 4830. <https://doi.org/10.3390/app10144830>.

[14] C. Gómez-Urios, Choline chloride-based natural deep eutectic solvents for the extraction and stability of phenolic compounds, ascorbic acid, and antioxidant capacity from *Citrus sinensis* peel, (2023).

[15] Y. Dai, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*), *Food Chemistry* 159 (2014) 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.155>.

[16] M. Zdanowicz, Deep eutectic solvents based on urea, polyols and sugars for starch treatment, *International Journal of Biological Macromolecules* 176 (2021) 387–393. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.039>.

[17] K. Radošević, N. Ćurko, V. Gaurina Srček, M. Cvjetko Bubalo, M. Tomašević, K. Kovačević Ganić, I. Radojčić Redovniković, Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity, *LWT* 73 (2016) 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.037>.

[18] X. Wang, Z. Zeng, Z. Tian, J. Sun, Y. Li, X. Fan, Validation of spectrophotometric determination of chlorogenic acid in fermentation broth and fruits, *Food Chemistry* 278 (2019) 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.041>.

[19] J. Abraham, International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, in: C. Tietje, A. Brouder (Eds.), *Handbook of Transnational Economic Governance Regimes*, Brill | Nijhoff, 2010: pp. 1041–1053. <https://doi.org/10.1163/ej.9789004163300.i-1081.897>.

[20] R.E. Bruns, I.S. Scarminio, B. de Barros Neto, *Statistical design--chemometrics*, 1st ed, Elsevier, Amsterdam ; Boston, 2006.

- [21] J. Pires, P.B. Torres, F. Chow, D. Santos, Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas, (2017). <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.27450.08640>.
- [22] V. Urrea-Victoria, Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas, Instituto de Biociências - USP, 2016.
- [23] A. Zulueta, M.J. Esteve, A. Frígola, ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products, *Food Chemistry* 114 (2009) 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.033>.
- [24] S.M. Moosavi, S. Ghassabian, Linearity of Calibration Curves for Analytical Methods: A Review of Criteria for Assessment of Method Reliability, in: M.T. Stauffer (Ed.), *Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches*, InTech, 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72932>.
- [25] G.R. Martins, A.F. Monteiro, F.R.L. Do Amaral, A.S. Da Silva, A validated Folin-Ciocalteu method for total phenolics quantification of condensed tannin-rich açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seeds extract, *J Food Sci Technol* 58 (2021) 4693–4702. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04959-5>.
- [26] T.P. Nascimento, K.C. Ladeira, F.D.S. Bezerra, M.C.B. Santos, T.S.P. De Souza, L.C. Cameron, M.S.L. Ferreira, M.G.B. Koblitz, Metabolomic analysis and ecofriendly enrichment of sunflower meal extract, *J Sci Food Agric* 103 (2023) 1161–1171. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12210>.
- [27] C. Fanali, S. Della Posta, L. Dugo, A. Gentili, L. Mondello, L. De Gara, Choline-chloride and betaine-based deep eutectic solvents for green extraction of nutraceutical compounds from spent coffee ground, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 189 (2020) 113421. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113421>.
- [28] A.S. Sara, C. Mathé, M. Basselin, F. Fournier, A. Aymes, M. Bianeis, O. Galet, R. Kapel, Optimization of sunflower albumin extraction from oleaginous meal and characterization of their structure and properties, *Food Hydrocolloids* 99 (2020) 105335. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105335>.
- [29] M. Naveed, V. Hejazi, M. Abbas, A.A. Kamboh, G.J. Khan, M. Shumzaid, F. Ahmad, D. Babazadeh, X. FangFang, F. Modarresi-Ghazani, L. WenHua, Z. XiaoHui, Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 97 (2018) 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>.
- [30] L. Zeng, R. Xiang, C. Fu, Z. Qu, C. Liu, The Regulatory effect of chlorogenic acid on gut-brain function and its mechanism: A systematic review, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 149 (2022) 112831. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112831>.
- [31] A. Escarpa, M.C. González, Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods, *Analytica Chimica Acta* 427 (2001) 119–127. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)01188-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01188-0).
- [32] N. Mikołajczak, M. Tańska, D. Ogrodowska, Phenolic compounds in plant oils: A review of composition, analytical methods, and effect on oxidative stability, *Trends in Food Science & Technology* 113 (2021) 110–138. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.046>.



- [33] J.L. Aleixandre-Tudo, A. Buica, H. Nieuwoudt, J.L. Aleixandre, W. Du Toit, Spectrophotometric Analysis of Phenolic Compounds in Grapes and Wines, *J. Agric. Food Chem.* 65 (2017) 4009–4026. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01724>.
- [34] V. Vorobyova, M. Skiba, G. Vasyliov, Extraction of phenolic compounds from tomato pomace using choline chloride-based deep eutectic solvents, *Food Measure* 16 (2022) 1087–1104. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01238-5>.
- [35] A.M. Salamatullah, K. Hayat, F.M. Husain, M.A. Ahmed, S. Arzoo, M. Musaad Althbiti, A. Alzahrani, B.A.M. Al-Zaied, H. Kahlil Alyahya, N. Albader, H.-A. Nafidi, M. Bourhia, Effects of Different Solvents Extractions on Total Polyphenol Content, HPLC Analysis, Antioxidant Capacity, and Antimicrobial Properties of Peppers (Red, Yellow, and Green (*Capsicum annum* L.)), *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2022 (2022) 1–11. <https://doi.org/10.1155/2022/7372101>.
- [36] N. Dabetic, V. Todorovic, A. Malenovic, S. Sobajic, B. Markovic, Optimization of Extraction and HPLC–MS/MS Profiling of Phenolic Compounds from Red Grape Seed Extracts Using Conventional and Deep Eutectic Solvents, *Antioxidants* 11 (2022) 1595. <https://doi.org/10.3390/antiox11081595>.
- [37] I.V. Pires, Y.C.N. Sakurai, N.R. Ferreira, S.G.C. Moreira, A.M. Da Cruz Rodrigues, L.H.M. Da Silva, Elaboration and Characterization of Natural Deep Eutectic Solvents (NADESs): Application in the Extraction of Phenolic Compounds from pitaya, *Molecules* 27 (2022) 8310. <https://doi.org/10.3390/molecules27238310>.
- [38] T. Margraf, A.R. Karnopp, N.D. Rosso, D. Granato, Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates, *Journal of Food Science* 80 (2015). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13077>.
- [39] M.B. Medina, Simple and Rapid Method for the Analysis of Phenolic Compounds in Beverages and Grains, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 1565–1571. <https://doi.org/10.1021/jf103711c>.
- [40] L.M. Magalhães, M.A. Segundo, S. Reis, J.L.F.C. Lima, A.O.S.S. Rangel, Automatic Method for the Determination of Folin–Ciocalteu Reducing Capacity in Food Products, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 5241–5246. <https://doi.org/10.1021/jf060324s>.
- [41] A.M. Delgado, M. Issaoui, N. Chammem, Analysis of Main and Healthy Phenolic Compounds in Foods, *J Aoac Int* 102 (2019) 1356–1364. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0128>.
- [42] M. Kalinowska, K. Gryko, E. Gołębiewska, G. Świdorski, H. Lewandowska, M. Pruszyński, M. Zawadzka, M. Kozłowski, J. Sienkiewicz-Gromiuk, W. Lewandowski, Fe(III) and Cu(II) Complexes of Chlorogenic Acid: Spectroscopic, Thermal, Anti-/Pro-Oxidant, and Cytotoxic Studies, *Materials* 15 (2022) 6832. <https://doi.org/10.3390/ma15196832>.
- [43] M.B. Medina, Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method, *Journal of Functional Foods* 3 (2011) 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.02.007>.
- [44] G.E. Lester, K.S. Lewers, M.B. Medina, R.A. Saftner, Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin–Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid, *Journal of Food Composition and Analysis* 27 (2012) 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.05.003>.

- [45] J. Pico, R.Y. Pismag, M. Laudouze, M.M. Martinez, Systematic evaluation of the Folin–Ciocalteu and Fast Blue BB reactions during the analysis of total phenolics in legumes, nuts and plant seeds, *Food Funct.* 11 (2020) 9868–9880. <https://doi.org/10.1039/D0FO01857K>.
- [46] K.C. Guimarães, D.L. Salgado, E.E.N. Carvalho, Evaluation of different methodologies for the determination of phenolic compounds in tropical fruits, *Braz. J. Food Technol.* 23 (2020) e2019015. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.01519>.
- [47] V. Ravindranath, J. Singh, G.K. Jayaprakasha, B.S. Patil, Optimization of Extraction Solvent and Fast Blue BB Assay for Comparative Analysis of Antioxidant Phenolics from Cucumis melo L., *Plants* 10 (2021) 1379. <https://doi.org/10.3390/plants10071379>.
- [48] A. Lama-Muñoz, M.D.M. Contreras, Extraction Systems and Analytical Techniques for Food Phenolic Compounds: A Review, *Foods* 11 (2022) 3671. <https://doi.org/10.3390/foods11223671>.
- [49] I.G. Munteanu, C. Apetrei, Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review, *IJMS* 22 (2021) 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>.
- [50] R. Rodrigues, M.B.P.P. Oliveira, R.C. Alves, Chlorogenic Acids and Caffeine from Coffee By-Products: A Review on Skincare Applications, *Cosmetics* 10 (2023) 12. <https://doi.org/10.3390/cosmetics10010012>.

