

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

ANNA KAROLINA GOMES OLIVEIRA

**UTILIZAÇÃO DE SOLVENTES EUTÉTICOS NATURAIS PROFUNDOS NA
EXTRAÇÃO DE BETALAÍNAS DE CASCAS DE *Beta vulgaris* L. var. *esculenta*
PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS**

FRANCISCO BELTRÃO

2022

ANNA KAROLINA GOMES OLIVEIRA

**UTILIZAÇÃO DE SOLVENTES EUTÉTICOS NATURAIS PROFUNDOS NA
EXTRAÇÃO DE BETALAÍNAS DE CASCAS DE *Beta vulgaris* L. var. esculenta
PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS**

**Use of natural deep eutectic solvents in the extraction of betalains from the
peel of *Beta vulgaris* L. var. esculenta for application in the food industry.**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do título
de Bacharel em Engenharia Química da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Claudia Eugênia Castro Bravo
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Ellen Porto Pinto
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Irede Angela Lucini
Dalmolin

FRANCISCO BELTRÃO

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

ANNA KAROLINA GOMES OLIVEIRA

**UTILIZAÇÃO DE SOLVENTES EUTÉTICOS NATURAIS PROFUNDOS NA
EXTRAÇÃO DE BETALAÍNAS DE CASCAS DE *Beta vulgaris* L. var. *esculenta*
PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do título
de Bacharel em Engenharia Química da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 10 de Novembro de 2022

Claudia Eugênia Castro Bravo

Doutorado

Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Francisco Beltrão

Ellen Porto Pinto

Doutorado

Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Francisco Beltrão

Irede Angela Lucini Dalmolin

Doutorado

Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Francisco Beltrão

“A folha de aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”

FRANCISCO BELTRÃO

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelos desafios e oportunidades que surgiram durante minha vida e por nunca me abandonar nos momentos difíceis.

À minha mãe, Suylan, por ser meu “porto seguro”. Por todo amor e conselhos, sempre me incentivando e apoiando em todas as decisões. E por ser o meu maior exemplo de determinação e força.

À minha querida avó, lêda, por todas as conversas e acalento ao longo de todos esses anos à distância. E por ser um exemplo de fé e otimismo para mim.

Ao meu pai do coração, Maurício, por todo apoio, carinho e por acreditar em mim.

À minha incrível irmã, Larissa, por deixar minha vida mais alegre, leve e cheia de luz com todo seu amor e inocência.

Ao meu namorado, Cassiano, por todo carinho e amor. E por toda ajuda nos momentos difíceis, sendo meu companheiro e amigo.

À minha tia Geórgia, por toda amizade e carinho. Por sempre me dar forças e acreditar em meu potencial.

Ao comitê de orientação, Prof.^a Claudia Castro, Prof.^a Irede Dalmolin e Prof.^a Ellen Porto, por todo conhecimento compartilhado e por suas orientações e dedicação durante este período.

A todos os familiares e amigos em geral, por todo carinho e incentivo ao longo de toda minha vida.

Às amigas Marília, Patrícia, Mariana e Evellin por todo companheirismo, ajuda e amizade nos momentos de alegria e tristeza. Vocês tornaram essa jornada muito mais leve.

A todos que colaboraram, de alguma maneira, para o desenvolvimento deste trabalho e não foram citados.

O presente trabalho recebeu recursos financeiros provenientes do Edital 07/2022 – DIRGRAD/DIRGE da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR-FB - Apoio à execução de trabalhos de conclusão de cursos.

RESUMO

Os solventes eutéticos naturais profundos (NADES) são uma alternativa aos solventes orgânicos convencionais utilizados na extração de substâncias bioativas de origem vegetal. São formados por metabólitos primários, açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, logo, apresentam baixa toxicidade e maior biodegradabilidade. A betalaína é uma substância que confere coloração amarelo-alaranjado ou vermelho-violeta e é dividida em betacianinas e betaxantinas. Este pigmento possui atividade antioxidante, sendo um composto de interesse para a indústria alimentícia e farmacêutica. A beterraba é a principal fonte vegetal de betalaínas, e levando em consideração o aproveitamento de resíduos, o objetivo deste estudo foi otimizar a extração de betalaínas de cascas de beterraba (*Beta vulgaris* L. var *esculenta*) com a utilização de solventes eutéticos naturais profundos. Foi realizado um delineamento experimental empregando a metodologia de superfície de resposta, utilizando o solvente ácido cítrico/ sacarose com 30% de água (m/m) em três diferentes proporções mássicas (1:1, 1:2, 1:3), temperatura (25, 40 e 55 °C) e tempo (60, 120, 180 min), onde a variável de resposta considerada foi a quantificação de betalaínas. Em seguida, o ensaio com maior rendimento foi caracterizado segundo a quantidade de fenólicos totais e poder redutor e sequestrante de radicais livres de DPPH. Como resultado, o ensaio com condições de temperatura a 55 °C, tempo de 60 minutos e solvente eutético ácido cítrico/ sacarose (1:1) e 30% de água (m/m) apresentou o maior rendimento de 114,24 mg.100 mL⁻¹ para betacianinas e 46,4713 mg.100 mL⁻¹ para betaxantinas. A amostra analisada apresentou quantidade de fenólicos totais de 76,4970 µg de GAE.mg⁻¹ ou 367,19 µg de GAE.mL⁻¹ e alta porcentagem de inibição de 59,78% em uma concentração de 4000,84 µg.mL⁻¹. Além disso, o valor de EC₅₀ encontrado foi de 5,83 µg.mL⁻¹. Logo, as cascas de beterraba demonstraram ser uma potencial fonte de betalaínas. O solvente eutético testado apresentou um bom desempenho na extração de betalaínas comparado com solventes convencionais utilizados.

Palavras-chave: atividade antioxidante; fenólicos; otimização; solvente eutético.

ABSTRACT

Natural deep eutectic solvents (NADES) are an alternative to conventional organic solvents used in the extraction of bioactive substances of plant origin. They are formed by primary metabolites, sugars, amino acids and organic acids, therefore, they have low toxicity and greater biodegradability. Betalain is a substance that gives a yellow-orange or red-violet color and is divided into betacyanins and betaxanthins. This pigment has antioxidant activity, being a compound of interest for the food and pharmaceutical industry. Beetroot is the main plant source of betalains and, taking into account the use of residues, the objective of this study was to optimize the extraction of betalains from beetroot peel (*Beta vulgaris* L. var *esculenta*) using natural deep eutectic solvents. An experimental design was carried out using the response surface methodology, using the citric acid/sucrose solvent with 30% water (m/m) in three different mass proportions (1:1, 1:2, 1:3), temperature (25, 40 and 55 °C) and time (60, 120, 180 min), where the response variable was the quantification of betalains. Then the test with the highest yield was characterized according to the amount of total phenolics and reducing and scavenging power of DPPH free radicals. As a result, the test with temperature conditions at 55 °C, time of 60 minutes and eutectic solvent citric acid/sucrose (1:1) and 30% water (w/w) showed the highest yield of 114.24 mg.100 mL⁻¹ for betacyanins and 46.4713 mg.100 mL⁻¹ for betaxanthins. The analyzed sample showed a total amount of phenolics of 76.4970 µg of GAE.mg⁻¹ or 367.19 µg of GAE.mL⁻¹ and a high percentage of inhibition of 59.78% at a concentration of 4000.84 µg.mL⁻¹. Furthermore, the EC₅₀ value found was 5.83 µg.mL⁻¹. Therefore, beetroot peel proved to be a potential source of betalains. The eutectic solvent tested showed a good performance in the extraction of betalains compared to conventional solvents used.

Keywords: antioxidant activity; eutectic solvent; optimization; phenolics.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	OBJETIVOS	9
2.1	Objetivo Geral	9
2.2	Objetivos Específicos	9
3	FUNDAMENTAÇÃO TEORICA	10
3.1	Beterraba (<i>Beta vulgaris</i> L. var. <i>esculenta</i>)	10
3.2	Corantes Alimentícios	11
3.2.1	Corantes Naturais.....	12
3.2.1.1	<u>Betalainas</u>	13
3.3	Extração sólido-líquido	14
3.4	Solventes eutéticos naturais profundos (NADES)	15
3.4.1	Composição do NADES.....	16
3.4.2	Propriedades físico-químicas.....	17
3.4.2.1	<u>Viscosidade e Densidade</u>	17
3.4.2.2	<u>Análises Térmicas</u>	17
3.5	Metodologia de superfície de resposta	18
3.5.1	Modelos de segunda ordem.....	19
4	METODOLOGIA	21
4.1	Preparação do solvente eutético natural profundo	21
4.2	Preparação da matéria- prima	21
4.3	Extração sólido-líquido	22
4.4	Quantificação dos compostos bioativos	22
4.5	Planejamento Experimental	23
4.6	Quantificação dos compostos fenólicos totais	24
4.6.1	Elaboração da curva-padrão de compostos fenólicos totais.....	25
4.7	Avaliação da atividade antioxidante	26
4.7.1	Elaboração da curva-padrão de atividade antioxidante.....	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
5.1	Escolha e preparação dos solventes	28
5.2	Otimização da extração de betalainas	29
5.3	Quantificação dos compostos fenólicos totais	37
5.4	Avaliação da atividade antioxidante	38
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

Desde o começo do século XX a imagem da química é associada às produções industriais e suas consequências. Os impactos dessas atividades na saúde e no meio ambiente evidenciam a urgência na discussão de temas como sustentabilidade e química verde, tanto no âmbito industrial como no acadêmico (FERREIRA *et al.*, 2014).

Em 1998, a definição da química verde foi proposta por John Warner e Paul Anastas como o desenvolvimento de processos e produtos químicos com o intuito de eliminar ou reduzir a geração ou o uso de substâncias perigosas. A química verde possui 12 princípios, dentre eles podemos destacar: síntese de reações químicas menos perigosas, diminuição dos níveis de toxicidade de produtos químicos e a utilização de solventes mais seguros (FARRÁN *et al.*, 2015).

A maioria dos solventes utilizados na indústria são substâncias orgânicas e apresentam grande toxicidade. No entanto, a busca por solventes “verdes” que proporcionam menor impacto ambiental tem aumentado. Entre os solventes “verdes” os líquidos iônicos (LIs) destacam-se. Os LIs são, por definição, sais que possuem um ponto de fusão baixo e que apresentam baixa volatilidade, baixa pressão de vapor e podem ser reutilizados. No entanto, apresentam desvantagens incluindo alta toxicidade, baixa biodegradabilidade, alto custo e síntese complexa (ÜNLÜ; ARIKAYA; TAKAÇ, 2019).

Uma alternativa que supera as limitações dos solventes orgânicos convencionais e dos LIs, são os solventes eutéticos profundos (*Deep Eutectic Solvents - DES*). Geralmente são formados por dois ou três componentes não tóxicos e biodegradáveis sendo um doador de ligação de hidrogênio (*Hydrogen Bond Donor - HBD*) e outro um receptor de ligação de hidrogênio (*Hydrogen Bond Acceptor - HBA*). Ou seja, possuem uma similaridade com os LIs, porém com menor toxicidade, maior biodegradabilidade, baixo custo e facilidade produção (WANG *et al.*, 2020).

Em contrapartida, os DES apresentam alta viscosidade e podem ser encontrados em estado sólido à temperatura ambiente, o que dificulta sua aplicação como solventes na técnica de extração. Por sua vez, os solventes eutéticos naturais profundos (*Natural Deep Eutectic Solvents - NADES*) são

formados por componentes naturais e metabólitos primários, assim como por açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos. Podem ser considerados uma alternativa como solventes por possuírem características que favorecem a extração como: estado líquido até mesmo em temperaturas abaixo de 0 °C, sustentabilidade, possível ajuste de viscosidade e baixo custo (DAI *et al.*, 2013).

Com o crescimento do consumo de produtos naturais, torna-se necessário o desenvolvimento de novos produtos e técnicas para utilização na indústria alimentícia. Os avanços incluem a obtenção de corantes através de fontes naturais, visto que o interesse por esses produtos tem aumentado em detrimento dos corantes sintéticos que são prejudiciais à saúde (FERNÁNDEZ-LÓPEZ; ALMELA, 2001).

A variedade de cores das plantas geralmente deve-se às quatro classes de pigmentos: antocianinas, carotenóides, clorofilas e betalaínas (KAIMAINEN, 2014). As betalaínas são pigmentos que se dividem em dois grupos com diferentes estruturas: betaxantinas (coloração amarela) e betacianinas (coloração vermelho/violeta) (TANAKA *et al.*, 2008). A estabilidade das betalaínas pode influenciar na sua aplicação como corantes alimentícios, visto que pode ser afetada pelo pH, temperatura, oxigênio e luz (KAIMAINEN, 2014). A técnica mais comum para obtenção de betalaínas é a extração por maceração com a utilização de solventes comuns como água, metanol e etanol (AZEREDO, 2008).

A disponibilidade da beterraba e o preço baixo representam vantagens para utilização desse vegetal em larga escala na indústria de alimentos. As raízes de diferentes espécies de beterraba *Beta vulgaris* L. são uma das fontes naturais mais estudadas de betalaínas, que podem variar entre 30,9 e 445 mg de betacianinas. 100 g⁻¹ e 16,3 a 242 mg de betaxantinas. 100 g⁻¹ (SILVA *et al.*, 2020).

Algumas frutas e flores, como figo da Índia (*Opuntia ficus-indica*), cascas de pitaia vermelha (*Hylocereus polyrhizus*) e gonfrena (*Gomphrena globosa* L.) também se mostraram importantes fontes desses pigmentos em concentrações que variam de 13,4 mg de betacianinas. 100 g⁻¹ a 469 mg de betacianinas. 100 g⁻¹ e 4,54 mg de betaxantinas. 100 g⁻¹ a 24,3 mg de betaxantinas. 100 g⁻¹ (KUGLER; STINTZING; CARLE, 2007; PRAKASH; MANIKANDAN, 2012; FARIDAH; HOLINESTI; SYUKRI, 2015).

A produção em escala industrial, embalagem, processamento, mercado de varejo e consumo doméstico da beterraba resulta em um desperdício de 30 a 50% em todo o mundo (NIRMAL *et al.*, 2021). A extração de pigmentos (betalaínas) é uma alternativa para valorização e aproveitamento dos resíduos da beterraba (CELLI; BROOKS, 2017) .

Visto que, a necessidade de obter corantes naturais de uma forma mais branda possibilitando a melhora na sua estabilidade e aumento do rendimento está diretamente atrelada à aplicação de novas técnicas de extração com solventes mais naturais, o objetivo da presente pesquisa é a preparação do solvente eutético natural profundo (NADES) para posterior aplicação em diversas condições de extração de betalaínas contidas nas cascas da beterraba (*Beta vulgaris* L. var. *esculenta*).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Aplicação de solvente eutético natural profundo na extração de betalaínas de cascas da beterraba (*Beta vulgaris L. var. esculenta*).

2.2 Objetivos Específicos

- Preparar o solvente eutético natural profundo NADES em diferentes condições de proporção mássica;
- Analisar os efeitos da temperatura, tempo e solvente eutético no processo de extração;
- Avaliar a utilização das cascas de beterraba como fonte de betalaínas;
- Caracterizar os extratos obtidos quanto a sua atividade antioxidante e quantidade de compostos fenólicos totais;
- Definir qual a condição ótima de extração considerando o rendimento de betalaínas como variável de resposta.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Beterraba (*Beta vulgaris* L. var. *esculenta*)

Popularmente conhecida como beterraba, a *Beta vulgaris* L. var. *esculenta* é uma hortaliça da família Chenopodiaceae originária do norte da África e do sul e leste da Europa. Ela se destaca por possuir tanto na parte aérea quanto nas raízes um excelente valor nutritivo (TRANI *et al.*, 1993; TIVELLI *et al.*, 2011).

A Beterraba é uma das principais hortaliças cultivadas no Brasil. Existem diferentes tipos, dos quais três possuem grande interesse econômico: *Beta vulgaris crassa* ou “forrageira”, utilizada na alimentação animal; *Beta vulgaris altissima* ou “açucareira” utilizada para produção de açúcar; *Beta vulgaris* L. var. *esculenta* ou “hortícola” possuindo coloração vermelha é a mais popular no Brasil. Sua presença foi comprovada na Grécia desde 425 a.C e existem relatos da utilização da beterraba de raiz branca na Sicília no ano 1000 a.C. As beterrabas cultivadas atualmente são derivadas da forma primitiva *Beta vulgaris perennis* (TIVELLI *et al.*, 2011; PINHEIRO, 2011).

Segundo o Censo Agropecuário de 2017 (IBGE 2017), 134.469 toneladas de beterraba foram produzidas. Uma queda quando comparado com dados de 2006 em que aproximadamente 177.154 toneladas de beterraba foram produzidas, com destaque para as regiões Sul (43,57%), Sudeste (38,05%) e Nordeste (11,37%). Os estados com maior produção eram: Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Bahia. Vale ressaltar que o Paraná foi responsável por 49,84% da produção regional e 21,71% da produção nacional (IBGE, 2009). Tal queda justifica-se pelos fatores climáticos desfavoráveis dos últimos 15 anos

O sistema radicular pivotante da beterraba é constituído de uma raiz principal desenvolvida que penetra no solo, podendo atingir até 60 cm de profundidade e poucas ramificações laterais, desenvolvendo raiz do tipo tuberosa púrpura (TIVELLI *et al.*, 2011).

O bulbo da beterraba, principal parte comestível da raiz, é constituído em sua parte interna por faixas circulares de tecidos condutores de nutrientes que são estreitas e com coloração clara, alternadas com faixas de tecido largas e escuras que armazenam nutrientes como: fósforo, ferro, sódio, potássio, vitamina A,

tiamina, riboflavina, niacina e ácido ascórbico (BASSI, 2014). Essas faixas circulares podem ser observadas na Figura 1 abaixo:

Figura 1 - Beterraba vermelha (*Beta vulgaris* L. var. *esculenta*)



Fonte: Google Creative Commons (2021)

A beterraba é a principal fonte de betalaínas, que são pigmentos que conferem coloração amarelo alaranjado ou vermelho-violeta. Além disso, apresenta atividade sobre radicais livres, destacando-a como um dos dez antioxidantes mais potentes. Outras propriedades conferidas pelas betalaínas incluem atividades antimicrobianas e antivirais (VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009).

O extrato da beterraba possui a única fonte de betalaínas comercialmente autorizada e foi estabelecida como a mais antiga e abundante fonte de corante alimentício vermelho natural, conhecido como betanina ou E-162 na União Europeia (ABEROUMAND, 2011; RORIZ *et al.*, 2017). Esse pigmento é utilizado principalmente na indústria de alimentos em sobremesas, iogurtes, produtos em pó, sorvetes, salsichas e carnes processadas (AZEREDO, 2008; ABEROUMAND, 2011; DALLA COSTA, 2015). A betanina também pode ser utilizada como corante na indústria farmacêutica e em cosméticos (GUEDES, 2015).

3.2 Corantes Alimentícios

Segundo o Item 1.2 da Portaria SVS/MS 540/97, aditivos são quaisquer ingredientes adicionados aos alimentos com o intuito de alterar características físicas, biológicas, químicas ou sensoriais que são perdidas ou alteradas durante a fabricação, sem o objetivo de nutrir (BRASIL, 2002a). Os corantes são aditivos que

intensificam e restauram a cor de um alimento. Um dos aspectos mais afetados durante o processamento é a cor, por essa razão a utilização de corantes é fundamental, a fim de tornar os alimentos mais atrativos, aparentando ter mais qualidade e sabor. Esses fatores fazem com que os corantes sejam considerados importantes para a comercialização de alimentos (CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002).

De acordo com a resolução nº 44/77 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA), do Ministério da Saúde (BRASIL,2002b), os corantes permitidos para uso em alimentos e bebidas são classificados da seguinte forma: corantes sintéticos, idênticos à natureza, inorgânicos e naturais. Corantes sintéticos são aqueles que não se encontram na natureza e são sintetizados pelos humanos, assim como os idênticos aos naturais, exceto pelo fato de que esses podem ser encontrados na natureza. Os corantes inorgânicos são obtidos a partir de substâncias minerais. Corantes naturais são pigmentos extraídos de organismos vivos: vegetais, algas, insetos fungos e cianobactérias.

3.2.1 Corantes Naturais

Segundo o artigo 10 do Decreto nº 55.871 de 26 de março de 1965, é considerado corante natural, o pigmento ou corante inócuo extraído de substância vegetal ou animal (BRASIL, 2002c).

Os pigmentos naturais podem ser divididos em quatro grandes classes: as clorofilas que são os principais pigmentos verdes e são essenciais para a fotossíntese; as antocianinas são pigmentos da classes dos flavonóides que abrangem as cores azul, vermelho e violeta; os carotenóides fazem parte dos compostos terpenóides localizados nos cloroplastos e cromoplastos e podem apresentar as cores laranja, vermelho ou amarelo (TANAKA *et al.*, 2008; KAIMANEN, 2014) e as betalaínas que são os objetos de estudo desta pesquisa.

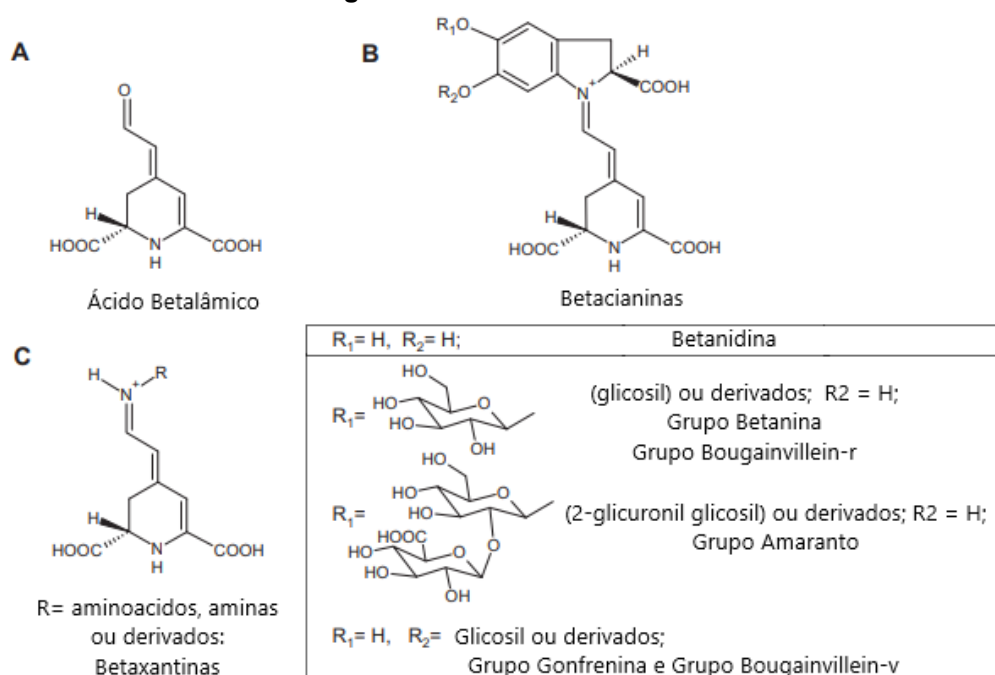
Schiozer e Barata (2007), afirmam que um desafio a ser superado para amplificar a utilização de corantes naturais é a sua baixa estabilidade. Essa estabilização deve ocorrer de forma natural. Não há uma definição exata, mas alguns estudos indicam que reações com enzimas, aquecimento e extração com solventes mais brandos devem auxiliar.

3.2.1.1 Betalainas

As betalainas são classificadas em dois grupos de acordo com suas características estruturais e propriedades de absorção de luz: betacianinas com coloração vermelho violeta e betaxantinas com coloração amarelo-alaranjado. As betacianinas podem ainda ser divididas em outros subgrupos: betanina, gonfrerina, amarantina e buganvília (POLTURAK; AHARONI, 2018).

No geral são formadas a partir dos produtos da condensação de uma amina primária ou secundária com o ácido betalâmico. A substituição do grupo amina define os dois grupos em que as betalainas são divididas. O grupo das betacianinas contém um anel aromático na forma de um grupo *ciclo-dopa*, já as betaxantinas podem ter como substitutos um grupo amina ou um aminoácido (KAIMAINEN, 2014; KHAN, 2015), conforme mostrado na Figura 2:

Figura 2 - Betacianinas e Betaxantinas



Fonte: Adaptado de Khan (2015)

Alguns fatores devem ser analisados em relação a estabilidade das betalainas para que haja uma otimização da extração dos pigmentos: pH, as betalainas são mais estáveis em uma faixa de pH 3 - 7, logo, recomenda-se a

adição de ácido ascórbico na extração deixando o pH ligeiramente ácido; oxigênio, as betalaínas reagem com o oxigênio molecular; luz, aceleram a degradação do pigmento levando a perda de cor e temperatura, a estabilidade do pigmento diminui com o aumento da temperatura e passa pela degradação com temperaturas superiores a 50 °C (TANAKA *et al.*, 2008; AZEREDO, 2008; KAIMANEN, 2014).

3.3 Extração sólido-líquido

A extração sólido-líquido é uma operação unitária de transferência de massa que ocorre a partir do contato de um sólido com uma fase líquida, com o objetivo de transferir compostos desejáveis da fase sólida para um solvente líquido. Essa técnica é uma das mais utilizadas para extração de pigmentos naturais e também na indústria de alimentos (TADINI *et al.*, 2016; SANTOS, 2017).

A cinética da extração envolve várias etapas, no entanto, grande parte do processo é limitado pela difusão devido a estrutura natural das plantas possuírem uma resistência à penetração dos líquidos solventes, tornando o processo mais lento (CISSÉ *et al.*, 2012). Segundo Tadini *et al.* (2016), alguns fatores devem ser observados, pois podem afetar a eficiência do processo de extração:

- I. Tamanho da partícula: a área superficial de contato do sólido é diretamente proporcional a taxa de transferência de massa, ou seja, ao reduzir o tamanho das partículas aumenta-se a superfície de contato e por consequência ocorre um aumento da taxa de extração. Porém, existem limites para que as partículas muito finas não causem compactação do leito e diminuam a eficiência do processo.
- II. Temperatura: geralmente quanto maior a temperatura, maior a solubilidade do soluto no solvente e maior é a taxa de extração. No entanto, altas temperaturas podem causar a degradação de alguns compostos, alterando sua qualidade. Dessa forma é necessário analisar os limites de temperatura em cada caso.
- III. Umidade: a água presente na fase sólida pode competir com o solvente na dissolução do soluto. Em algumas situações é necessário que haja umidade para que ocorra a transferência do soluto na extração. No caso de

substâncias lipossolúveis é necessária uma pré-secagem do material. Para substâncias hidrossolúveis a umidade é benéfica para o processo.

Novas técnicas de extração são desenvolvidas com objetivo de reduzir o tempo de extração e o consumo de solventes orgânicos, dessa forma aumentando a eficiência da extração. Todos esses esforços estão diretamente ligados à redução da poluição ambiental e dos custos do processo (HUANG *et al.*, 2013).

3.4 Solventes eutéticos naturais profundos (NADES)

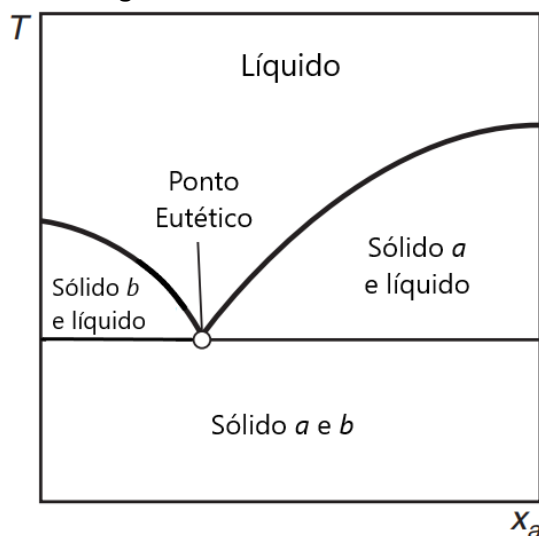
Os NADES podem ser definidos como a junção de dois ou mais produtos naturais em estado sólido que ao se misturarem passam para o estado líquido. Alguns desses componentes incluem aminoácidos, açúcares, cloreto de colina, e alguns ácidos orgânicos como: ácido málico, ácido láctico e ácido cítrico. Estes solventes estão presentes na natureza e desenvolvem um papel importante em vários processos celulares de organismos vivos (CHOI *et al.*, 2011; DAI *et al.*, 2013a; GARCIA *et al.*, 2016).

A maioria dos NADES possuem uma alta habilidade de solubilização de compostos polares, apolares, macromoléculas e alguns metabólitos são mais solúveis em NADES do que na água, demonstrando um grande potencial para sua utilização como solventes na extração de metabólitos secundários. São compostos majoritariamente de metabólitos primários o que garante uma aplicação segura em áreas relacionadas à saúde, além disso possuem baixa viscosidade, biocompatibilidade e são sustentáveis (CHOI *et al.*, 2011; DAI *et al.*, 2013a; DAI *et al.*, 2013b).

Os NADES, assim como os DES são formados a partir de um componente doador de ligação de hidrogênio (*Hydrogen Bond Donor - HBD*) e outro um receptor de ligação de hidrogênio (*Hydrogen Bond Acceptor - HBA*). Dessa forma possuem um ponto de fusão menor do que o ponto de fusão dos componentes individuais que fazem parte da composição, essa diminuição pode ser explicada através das forças intermoleculares por ligações de hidrogênio. Esse fenômeno também ocorre em misturas eutéticas, por esse motivo, são denominados Solventes Eutéticos Naturais Profundos (CHOI *et al.*, 2011; PAIVA *et al.*, 2014).

A Figura 3 mostra um diagrama de fases de uma mistura binária, onde é possível observar que a adição de outra espécie à mistura causa a diminuição do ponto de fusão, até a formação do ponto eutético. O ponto eutético é a menor temperatura possível onde uma mistura encontra-se somente em estado líquido (KORETSKY, 2013).

Figura 3 - Diagrama de fases de uma mistura binária



Fonte: Adaptado de Koretsky (2013)

3.4.1 Composição do NADES

O ácido cítrico é um ácido tricarbóxico que não apresenta cor e é solúvel em água. É um metabólito comum de animais e plantas que também está presente em sucos de frutas ácidas. O ácido cítrico é o principal intermediário do metabolismo dos carboidratos, além disso é biodegradável, seguro, econômico e versátil. Pode ser utilizado na produção de sais efervescentes, refrigerantes e citratos medicinais (ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2013).

A sacarose é formada através da união de dois monossacarídeos, frutose e glicose, ou seja, é um dissacarídeo. Pode ser naturalmente encontrada em alguns vegetais como pêssigo (7%), beterraba (6,1%) e cana-de-açúcar (14-24%). Comercialmente é extraída da cana-de-açúcar ou da beterraba, formando soluções concentradas com alto poder osmótico que possuem efeito umectante, preservativo

e crioprotetor em alimentos (OETTERER; SARMENTO, 2006; MANHANI *et al.*, 2014).

A sacarose é utilizada como receptor de ligação de hidrogênio (*Hydrogen Bond Acceptor - HBA*) e o ácido cítrico como doador de ligações de hidrogênio (*Hydrogen Bond Donor - HBD*). De acordo com Savi (2019), três proporções apresentam mistura homogênea, com formação do ponto eutético, confirmado através de análises térmicas e sem formação de precipitados sólidos ou cristais: 1:1, 1:2, 1:3 (fração mássica) de ácido cítrico e sacarose e, portanto, foram consideradas para avaliação neste estudo.

3.4.2 Propriedades físico-químicas

Os NADES são solventes altamente adaptáveis, pois várias características e propriedades físico-químicas podem ser controladas de acordo com a fração molar dos componentes, teor de água e temperatura (ABBOTT *et al.*, 2004; GHAEDI *et al.*, 2017).

3.4.2.1 Viscosidade e Densidade

O estudo da viscosidade e densidade são fundamentais em operações que envolvem transferência de calor, momento e massa, assim como em colunas de destilação, trocadores de calor, absorção, adsorção, escoamento e extração (ALOMAR *et al.*, 2016; GHAEDI *et al.*, 2017).

A densidade e a viscosidade diminuem com o aumento da temperatura, além disso, a fração molar e o teor de água também afetam as propriedades físico-químicas. Adicionar uma pequena quantidade de água ao NADES resulta em uma diminuição do tempo de preparo e da viscosidade. Os NADES apresentam altas viscosidades devido às fortes ligações de hidrogênio entre os seus componentes, dessa forma diminuindo a mobilidade das moléculas, porém permanecem líquidos em temperatura ambiente e até mesmo em temperaturas mais baixas (DAI *et al.*, 2013a; ALOMAR *et al.*, 2016; GHAEDI *et al.*, 2017).

3.4.2.2 Análises Térmicas

Análises térmicas são técnicas que possibilitam avaliar o comportamento dos sistemas em temperaturas programadas. Uma dessas técnicas é a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), utilizada para estudar a temperatura de transição vítrea (T_g), estabilidade térmica e o ponto de fusão de compostos diferentes (YANG *et al.*, 2011; CRAVEIRO *et al.*, 2016).

Outra técnica utilizada é a Análise Termogravimétrica (TGA) que se baseia na variação de massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo, resultando em transformações químicas ou físicas (RIEGEL *et al.*, 2008). Através da análise TGA, é possível verificar se houve a formação do NADES, comparando os termogramas da mistura com os termogramas dos compostos individuais, por meio da sobreposição (SAVI, 2019).

3.5 Metodologia de superfície de resposta

A metodologia de superfície de resposta consiste numa ferramenta estatística e matemática capaz de avaliar simultaneamente como diferentes variáveis, denominadas fatores, podem influenciar um processo e otimizar as condições experimentais (CHEN; ZHAO; YU, 2015). Geralmente, os processos de otimização são realizados através do monitoramento de uma variável por vez, onde sua influência sobre uma resposta experimental é observada. Dessa forma, na otimização univariada todas as outras variáveis são fixadas enquanto a variável analisada é alterada. Esta técnica pode acabar resultando em um alto custo e grande volume de experimentos, além de desconsiderar a interação entre as variáveis dificultando a identificação de ótimos verdadeiros (PERALTA-ZAMORA *et al.*, 2005; NOVAES *et al.*, 2017).

A aplicação de técnicas de otimização multivariada resulta em uma grande economia devido a redução da quantidade de experimentos, tempo e menor gasto de reagentes. O método é baseado em modelos matemáticos que possibilitam avaliar a significância estatística dos fatores e a interação entre eles, permitindo otimização simultânea (NOVAES *et al.*, 2017).

Através dos planejamentos fatoriais é possível avaliar a interação entre os fatores e analisar sua influência na variável de resposta. O experimento fatorial fracionado ou incompleto permite que apenas parte do experimento seja realizado por meio de equações capazes de determinar quais interações são mais relevantes, dessa forma reduzindo a quantidade de experimentos (CIRILLO, 2015).

De acordo com Barros Neto, Scarminio e Bruns (2001), para realizar um planejamento fatorial completo todas as possíveis combinações dos fatores e dos níveis devem ser realizadas experimentalmente. Por exemplo, se houver n_1 níveis do primeiro fator, n_2 do segundo e n_k do fator k o planejamento será um fatorial $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$. Porém, apenas se trata do número mínimo de experimentos para realização de um planejamento fatorial completo.

A modelagem da metodologia de superfícies de resposta geralmente é realizada com o ajuste de modelos lineares ou quadráticos (primeira ou segunda ordem) às respostas obtidas anteriormente com o planejamento fatorial (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

3.5.1 Modelos de segunda ordem

Para utilizar os modelos de segunda ordem, os planejamentos experimentais utilizados são o Delineamento Composto Central (DCC) e o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (MONTGOMERY, 2013).

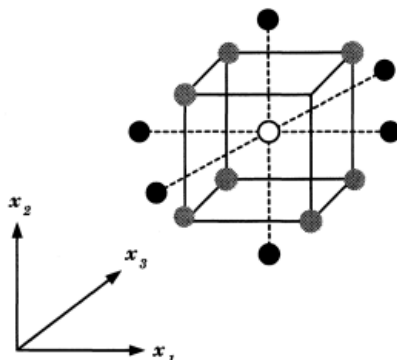
O DCC é constituído de um ou mais pontos centrais executados em réplicas, para o cálculo de pontos axiais ou estrelas, localizados a uma distância α em relação às arestas ou médias do nível (CLÍMACO, 2019).

Segundo Barros Neto *et al.* (2001) um planejamento composto central para k fatores (x_1, \dots, x_k) é formado por três partes:

- I. Parte fatorial, com um total de n_{fat} pontos de coordenadas $x_i = -1$ ou $+1$, para todos os $i = 1, \dots, k$;
- II. Parte axial ou estrela, constituída de $n_{ax} = 2k$ pontos em qualquer coordenada nula, exceto a que é igual a um valor α ou $-\alpha$;
- III. Número de ensaios realizados no ponto central n_{centro} , onde $x_1 = \dots x_k = 0$.

Na Figura 4, pode-se observar essas três etapas que constituem o planejamento composto, onde bolas cinzas equivalem a parte cúbica para um ensaio fatorial 2^3 e as bolas pretas representam a parte axial ou estrela.

Figura 4 - Planejamento de composição central para três fatores



Fonte: Barros Neto, Scarminio e Bruns (2001)

A Equação 1 é utilizada para descrever a influência dos fatores na variável de resposta (y):

$$y = \beta_0 + \sum_i \beta_i x_i + \sum_i \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (1)$$

Onde x_i e x_j representam as variáveis ou fatores i e j . O erro experimental é representado por ε . Os parâmetros estimados do modelo são β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} . (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

O número de ensaios pode ser encontrado através da Equação 2, onde k são as variáveis e n_0 são os pontos centrais (KHURI; MUKHOPADHYAY, 2010):

$$n = 2^k + 2k + n_0 \quad (2)$$

Para cada fator no plano experimental do DCCR o número de pontos axiais deve ser igual a 2, e o número de pontos centrais deverá ser suficiente para estimar a variância. Para encontrar a região ótima, deve ser construído a partir de um composto central: fatorial 2^k + pontos centrais (CLÍMACO, 2019).

4 METODOLOGIA

A extração de betalaínas contidas nas cascas de beterraba utilizando solventes eutéticos foi realizada nos Laboratórios de Química e Bioquímica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), no campus Francisco Beltrão.

4.1 Preparação do solvente eutético natural profundo

Dai *et al.* (2013a) utilizam dois métodos para preparação dos NADES: evaporação a vácuo e agitação térmica. No presente trabalho foi utilizada a metodologia de agitação térmica, também descrita por Savi (2019) com adaptações.

Os dois componentes foram misturados nas proporções mássicas indicadas (1:1, 1:2 e 1:3) com quantidades de água pré-estabelecidas em 20% e 30% (m/m), em seguida foram acondicionados em um banho térmico com agitação a $50 \pm 5^\circ\text{C}$, até a observação da formação de um líquido claro e transparente por aproximadamente uma hora.

4.2 Preparação da matéria-prima

A beterraba (*Beta vulgaris* L. var. *esculenta*) foi adquirida em um supermercado local da cidade de Francisco Beltrão, localizada no Paraná, e transportada para o laboratório para posterior análise e conservada sob refrigeração em temperatura inferior à 5°C em refrigerador doméstico.

A preparação da matéria-prima seguiu a metodologia proposta por Zin e Bánvölgyi (2020), com algumas adaptações. As beterrabas foram lavadas em água corrente com objetivo de remover poeiras e demais sujidades. Após a limpeza, foram secas com papel toalha e descascadas com um descascador de legumes manual, resultando em cascas com aproximadamente 1 mm de espessura. Em seguida foram trituradas manualmente até obter-se pedaços com 2 a 5 mm de comprimento.

4.3 Extração sólido-líquido

A extração também foi realizada seguindo a metodologia proposta por Zin e Bangvölgyi (2020) com adaptações. Após alguns testes prévios com diversas proporções entre massa de beterraba e volume de solvente, uma proporção foi escolhida.

Foram pesadas 10 g da amostra fresca e adicionadas em um béquer forrado com papel alumínio para proteger do contato com a luz e evitar a degradação dos compostos de interesse. Em seguida, 12,5 mL do solvente foram adicionados e homogeneizados com um agitador mecânico durante 1 minuto.

As amostras foram direcionadas para agitação magnética com aquecimento e com variação do tempo (60, 120 e 180 min) e da temperatura (25, 40 e 55 °C), conforme o delineamento experimental. Após essa etapa, o conteúdo foi adicionado em tubos falcon e centrifugado por 40 minutos a 3700 rpm. O sobrenadante da centrifugação foi transferido para um tubo de ensaio e o precipitado foi descartado.

4.4 Quantificação dos compostos bioativos

Para a quantificação das betalaínas totais (betaxantinas e betacianinas), foi utilizada a metodologia descrita por Nilsson (1970), com adaptações. Onde 100 µL do sobrenadante obtido (seção 4.3) foi transferido para tubos de ensaio em triplicata e diluído com 9.900 µL de água destilada, seguido da homogeneização em vórtex e análise em espectrofotômetro digital UV-visível (Even Ltd.).

As absorvâncias analisadas neste teste foram nos comprimentos de onda de 480 nm para quantificar a vulgoxantina I (betaxantina) e 536 nm para quantificar a betanina (betacianina) e 600 nm para descontar possíveis interferentes e impurezas.

A quantificação das betacianinas e das betaxantinas presentes nos extratos obtidos foi realizada através da equação 3, baseada na lei de Lambert-Beer:

$$\text{Betaxantinas ou betacianinas} \left(\frac{\text{mg}}{100 \text{ mL de extrato}} \right) = \frac{A \times MM \times FD \times 10^2}{\epsilon \times l} \quad (3)$$

Onde A é a absorvância do extrato a 480 nm ou 536 nm subtraído da absorvância dos interferentes a 600 nm; MM é a massa molar de 550 g.mol⁻¹ para betacianinas e 339 g.mol⁻¹ para betaxantinas; FD representa o fator de diluição utilizado (100); ϵ é a absorvância molar de 60.000 L.mol⁻¹.cm⁻¹ e 48.000 L.mol⁻¹.cm⁻¹ para betacianinas e betaxantinas respectivamente; l é o comprimento do caminho óptico de 1 cm; 10^2 é um fator de correção para que os resultados sejam apresentados na unidade descrita na equação.

4.5 Planejamento Experimental

O planejamento experimental fatorial 2⁽³⁻⁰⁾ foi aplicado para determinar a influência no efeito e interações do solvente eutético (nas proporções 1:1, 1:2 e 1:3) com 30% de água (m/m), tempo e temperatura no processo de extração das betalainas. As variáveis foram estabelecidas em dois níveis de variação codificados como -1 (mínimo) e +1 (máximo). A Tabela 1 mostra a matriz do delineamento experimental 2⁽³⁻⁰⁾ e os níveis das variáveis estudadas. As variáveis independentes estudadas no delineamento experimental fatorial 2⁽³⁻⁰⁾ foram: solvente eutético (X_1), tempo (X_2), temperatura (X_3).

Tabela 1 - Matriz do delineamento experimental 2⁽³⁻⁰⁾ e os níveis das variáveis estudadas (continua)

Ensaio	Solvente Eutético (X_1)	Tempo (minutos) (X_2)	Temperatura (°C) (X_3)
11 (C)	2,0	120	40
2	3,0	60	25
6	3,0	60	55
10 (C)	2,0	120	40
4	3,0	180	25
7	1,0	180	55

Tabela 1 - Matriz do delineamento experimental 2⁽³⁻⁰⁾ e os níveis das variáveis estudadas (conclusão)

Ensaio	Solvente Eutético (X ₁)	Tempo (minutos) (X ₂)	Temperatura (°C) (X ₃)
1	1,0	60	25
8	3,0	180	55
3	1,0	180	25
5	1,0	60	55
9 (C)	2,0	120	40

Fonte: Aatoria Própria (2021)

Após verificar a influência no efeito e interações das variáveis solvente eutético (X₁), tempo (X₂), temperatura (X₃) as variáveis mais significativas no processo de extração das betalaínas foram selecionadas.

4.6 Quantificação dos compostos fenólicos totais

A metodologia de Rumbaoa *et al.* (2009), com adaptações, foi utilizada para quantificação dos compostos fenólicos totais, os experimentos analíticos foram realizados em triplicata. As primeiras etapas foram a preparação das soluções utilizadas no processo.

A solução do reagente Folin-Ciocalteu 0,25 N foi preparada retirando-se uma alíquota de 25 mL do Folin com concentração 2 N, transferindo-o para um balão volumétrico de 200 mL onde o volume foi completado com água ultrapura. O balão foi protegido da luz utilizando papel alumínio e armazenado na geladeira.

Para preparar a solução de Na₂CO₃ foram pesados 20 g de carbonato de sódio anidro (99,5% pureza) em um béquer. Em seguida, já em um balão volumétrico foi dissolvido com água destilada até atingir 100 mL e armazenado em temperatura ambiente.

Para determinação de fenólicos totais foram adicionados em tubos de ensaio 1000 µL de amostra (extrato), 0,5 mL de Folin ciocalteu e 7,5 mL de água

deionizada, aguardando o tempo de reação de 8 minutos para adicionar 1 mL da solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3). Os tubos foram agitados em vórtex e reagiram por 2 h protegidos da luz. Em seguida, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro digital UV-visível (Even Ltd.).

4.6.1 Elaboração da curva-padrão de compostos fenólicos totais

Para elaboração da curva-padrão, uma solução estoque foi preparada pesando-se 25,2 mg de ácido gálico, dissolvendo-o em 10 mL de etanol e o volume foi completado com água deionizada em balão volumétrico de 100 mL. Em seguida os pontos (diluições) foram preparados em tubos de ensaio, onde as concentrações variaram de 0 a 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ conforme a Tabela 2 abaixo.

Tabela 2 - Preparação das diluições de ácido gálico

Tubos	Solução de ácido gálico (mL)	Metanol (mL)	Concentração Final ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Massa ácido gálico (μg)
1	0,2	0,8	5	50,4
2	0,4	0,6	10	100,8
3	0,6	0,4	15	151,2
4	0,8	0,2	20	201,6
5	1,0	-	25	252,0
Branco	-	1,0	0	0,0

Fonte: Autoria Própria (2022)

Após a preparação das diluições, foram adicionados aos tubos 0,5 mL de Folin ciocalteau e 7,5 mL de água deionizada, aguardando o tempo de reação de 8 minutos para adicionar 1 mL da solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3). Os tubos foram homogeneizados e armazenados por 2 horas ao abrigo da luz. Após o tempo de espera foram realizadas as leituras a 725 nm e anotadas. Ao final, as leituras foram plotadas no Excel a fim de gerar a equação da reta e o R^2 que deverá apresentar valor próximo de 1.

4.7 Avaliação da atividade antioxidante

A metodologia de Brand-Williams *et al.* (1995), com adaptações, foi utilizada para avaliação da atividade antioxidante e os experimentos analíticos foram realizados em triplicata. Primeiramente deve-se preparar as soluções que serão utilizadas no processo.

Para preparar a solução de DPPH 0,06 mM foram pesados 6 mg de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e dissolvidos em um balão volumétrico de 250 mL com álcool metílico. A solução foi armazenada em vidro âmbar e coberta com papel alumínio.

Outras soluções preparadas foram metanol 50%, acetona 70% e solução controle. A solução controle é composta por 4 mL da solução metanol 50%, 4 mL da solução de acetona 70% com volume ajustado para 10 mL com água deionizada.

A partir do extrato obtido no ponto ótimo, foram preparados tubos de ensaio com diferentes diluições: 1:200 (4000,84 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); 1:400 (2000,42 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); 1:800 (1000,21 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); 1:1600 (500,105 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); 1:3200 (250,053 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); 1:6400 (125,026 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em triplicata.

Uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição do extrato foi transferida para as cubetas com 3,9 mL do radical DPPH. Para o controle foram adicionados 0,1 mL da solução controle com 3,9 mL do radical DPPH. As leituras foram realizadas a 515 nm após aguardar aproximadamente 2 horas até observar a estabilização da redução da absorbância. A habilidade da amostra de capturar o radical DPPH foi calculada através da Equação 4:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{Absorbância no controle} - \text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância no controle}} \times 100 \quad (4)$$

As absorbâncias obtidas nas diferentes diluições dos extratos foram plotadas no eixo y e a concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) no eixo x e assim pôde-se determinar a equação da reta. Para calcular a AAT (Atividade Antioxidante) deve-se substituir a absorbância equivalente a 50% da concentração do DPPH pelo y, dessa forma encontrando o resultado correspondente a quantidade de

amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (EC_{50}).

4.7.1 Elaboração da curva-padrão de atividade antioxidante

As diluições foram preparadas a partir da solução inicial de DPPH 0,06 mM em balões volumétricos de 10 mL com concentração variando de 10 mM até 60 mM conforme a Tabela 3.

Tabela 3 - Preparação das diluições de DPPH

Tubos	Soluções de DPPH (mL)	Metanol (mL)	Concentração Final (mM)
1	0	10,0	0
2	1,70	8,30	10
3	3,3	6,70	20
4	5,00	5,00	30
5	6,70	3,30	40
6	8,30	1,70	50
7	10,0	0	60

Fonte: Autoria Própria (2022)

Uma alíquota de 4 mL de cada solução foi transferida para cubetas de vidro e a leitura foi realizada em espectrofotômetro digital UV-Visível (Even Ltd.) a 515 nm, utilizando metanol como branco para zerar o equipamento. Ao final as leituras foram plotadas no Excel a fim de gerar a equação da reta e o R^2 que deverá apresentar valor próximo de 1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O método de extração mais eficiente deve maximizar a recuperação de compostos de interesse ao mesmo tempo em que não prejudique as propriedades bioativas do vegetal em estudo.

5.1 Escolha e preparação dos solventes

Vários fatores podem afetar o rendimento da extração, a escolha do solvente é um desses fatores. Para a escolha do NADES mais adequado a ser utilizado como solvente optou-se por uma combinação de um ácido orgânico e açúcar.

Outro fator que afeta o potencial de extração do NADES é a adição de água em sua composição. Em testes prévios foi possível notar que os solventes preparados com ácido cítrico e sacarose nas frações mássicas 1:1, 1:2 e 1:3 com 20% de água (m/m) demoraram o dobro do tempo para apresentar um aspecto homogêneo sem a presença de cristais, comparando com os solventes que apresentavam ácido cítrico e sacarose nas frações mássicas 1:1, 1:2 e 1:3 com 30% de água (m/m) em sua composição.

Ambos apresentaram coloração transparente levemente amarelada, porém o solvente com 20% de água tinha um aspecto mais viscoso do que o solvente com 30% de água. Conforme descrito por Dall Molin (2022) o solvente (1:1) com 20% de água apresentou valores para viscosidade de 12,17 MPa·s, já com 15% de água o valor foi 118,6 MPa·s, ambos a uma temperatura ambiente.

Considerando que a viscosidade influencia na capacidade de transferência de massa, e que alguns trabalhos relatam aumento da solubilidade do soluto, assim como do rendimento da extração com a diminuição da viscosidade (YANG *et al.*, 2011; DAI *et al.*, 2013a; ZHRINA *et al.*, 2018), o solvente escolhido para utilizar nas extrações foi ácido cítrico e sacarose (1:1, 1:2, 1:3) com 30% de água na composição, por ser menos viscoso.

Conforme alertado por Dai *et al.* (2015), a estrutura do NADES é preservada desde que a quantidade de água adicionada seja inferior a 50%, acima disso as ligações de hidrogênio são enfraquecidas gradualmente.

Outra observação é que o composto que se deseja extrair, as betalaínas, são hidrossolúveis. Dessa forma, a presença de água no solvente não prejudicaria o rendimento. Segundo Yang *et al.* (2018), a água é importante na estrutura e propriedades do NADES, podendo levar a um aumento da polaridade e redução da densidade e viscosidade.

5.2 Otimização da extração de betalaínas

Com base nos resultados experimentais, a quantificação de betacianinas e betaxantinas pode ser vista na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados da quantificação de betacianinas e betaxantinas em diferentes condições de extração

Ensaio	Solvente Eutético (X ₁)	Tempo (min) (X ₂)	Temperatura (°C) (X ₃)	Betacianinas (mg.100 mL ⁻¹)	Betaxantinas (mg.100 mL ⁻¹)
11 (C)	2,0	120	40	93,4389	44,7056
2	3,0	60	25	48,1861	32,2050
6	3,0	60	55	86,5333	39,0792
10 (C)	2,0	120	40	64,2889	27,7556
4	3,0	180	25	62,4861	32,6758
7	1,0	180	55	90,7194	43,1990
1	1,0	60	25	46,6278	30,5571
8	3,0	180	55	96,6778	42,2503
3	1,0	180	25	65,9083	33,0054
5	1,0	60	55	114,2472	46,4713
9 (C)	2,0	120	40	94,5389	45,1058

Fonte: Autoria própria (2022)

Observa-se que a quantificação de betacianinas variou entre 46,6278 a 114,2472 mg.100 mL⁻¹ e a quantificação das betaxantinas variou de 30,5571 à 46,4713 mg .100 mL⁻¹. O ensaio experimental que apresentou a melhor condição para de extração de betacianinas e betaxantinas foi o ensaio 5, com valores de 114,2472 mg.100 mL⁻¹ e 46,4713 mg.100 mL⁻¹, respectivamente. Este experimento foi conduzido com o solvente eutético na proporção 1:1 de ácido cítrico e sacarose (m/m), tempo de extração de 60 minutos e temperatura de 55 °C.

Em contrapartida, o ensaio 1, apresentou uma condição desfavorável para extração de betacianinas e betaxantinas, evidenciadas pelo menor índice de 46,62 mg.100 mL⁻¹ e 30,5571 mg.100 mL⁻¹, respectivamente.

De acordo com os resultados observados na Tabela 4, a diferença entre os ensaios 1 e 5 está representada pela modificação da temperatura. A diferença observada nas respostas indicou que os valores de betacianinas e betaxantinas aumentaram quando a temperatura foi modificada do nível mínimo (25 °C) para o nível máximo (55 °C).

Em estudo realizado por Clímaco (2019) o rendimento de betacianinas variou de 48,216 a 88,420 mg.100 g⁻¹ e o das betaxantinas variou de 30,671 a 89,705 mg.100 g⁻¹. As condições máximas de extração foram: tempo de 30 minutos e temperatura de 65 °C e tempo 20 minutos e temperatura 55 °C para betacianinas e betaxantinas, respectivamente. Foi utilizada a polpa da beterraba e água destilada como solvente para realizar a extração.

Já no trabalho desenvolvido por Zin e Bánvölgyi (2020) utilizando a casca da beterraba e solvente aquoso de etanol (15%), os valores encontrados para betaxantinas variaram de 12,23 a 95,25 mg.100 mL⁻¹ e os das betacianinas de 14,85 a 136,08 mg.100 mL⁻¹. A condição ótima foi a uma temperatura de 20 °C e tempo de 1 hora, resultando na extração de 83,911 mg.100 mL⁻¹ de betaxantinas e 151,214 mg.100 mL⁻¹ de betacianinas.

Em extrações realizadas com solventes convencionais e eutéticos para extrair betaninas (betacianina), Dias (2019) obteve os seguintes resultados: 144,90 mg.100 g⁻¹ com água; 4,60 mg.100 g⁻¹ com metanol; 3,00 mg.100 g⁻¹ com etanol; 141,20 mg.100 g⁻¹ com etanol e água (4:1); 56,14 mg.100 g⁻¹ com bicarbonato de sódio; 80,60 mg.100 g⁻¹ com ácido acético; 111,93 mg.100 g⁻¹ com Cloreto de colina (ChCl): ácido cítrico/ água (4:1); 82,47 mg.100 g⁻¹ com ChCl:ureia/ água (4:1) e 60,75 mg.100 g⁻¹ com ChCl:glicerol/ água (4:1).

Nota-se que a variação das respostas de quantidade de betacianinas e betaxantinas são amplas. É possível observar que os solventes com água na composição apresentam melhor desempenho na extração do que os demais solventes. Isso pode ser explicado pelo caráter hidrofílico das betalaínas. Outros fatores como pH do solvente, temperatura e proporção entre massa e volume também podem influenciar no resultado final.

Após realizar a análise estatística verificou-se que dos parâmetros estudados e seus níveis de variação, apenas a temperatura afetou significativamente a quantificação de betacianinas ($p \leq 0,05$).

Na Tabela 5 observam-se as estimativas dos efeitos de cada variável, suas interações e a significância ($p \leq 0,05$). O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,85232 para betacianinas, o que indica uma boa relação dos dados experimentais com a curva estabelecida pelo modelo matemático. Logo, somente 14,77% das variações de quantificação das betacianinas não puderam ser explicadas pelos fatores estudados, existindo outros fatores que poderiam ser importantes para conseguir uma maior quantificação de betacianinas.

Tabela 5 - Estimativas dos efeitos de cada variável, suas interações e significância ($p \leq 0,05$) na quantificação de betacianinas e betaxantinas

Variáveis e Interações	Efeitos betacianinas	p	Efeitos betaxantinas	p
Solvente Eutético (X_1)	-5,9048	0,626577	-1,75562	0,782452
Tempo (X_2)	5,0493	0,675562	0,70448	0,911238
Temperatura (X_3)	41,2424	0,032597*	10,63913	0,164755
$X_1 * X_2$	7,1730	0,558521	1,11648	0,860013
$X_1 * X_3$	-4,9729	0,680050	-2,41477	0,705878
$X_2 * X_3$	-11,7410	0,361470	-0,75508	0,904909
$X_1 * X_2 * X_3$	9,6632	0,441777	2,10523	0,741342

Números seguidos de asterisco (*) são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2022)

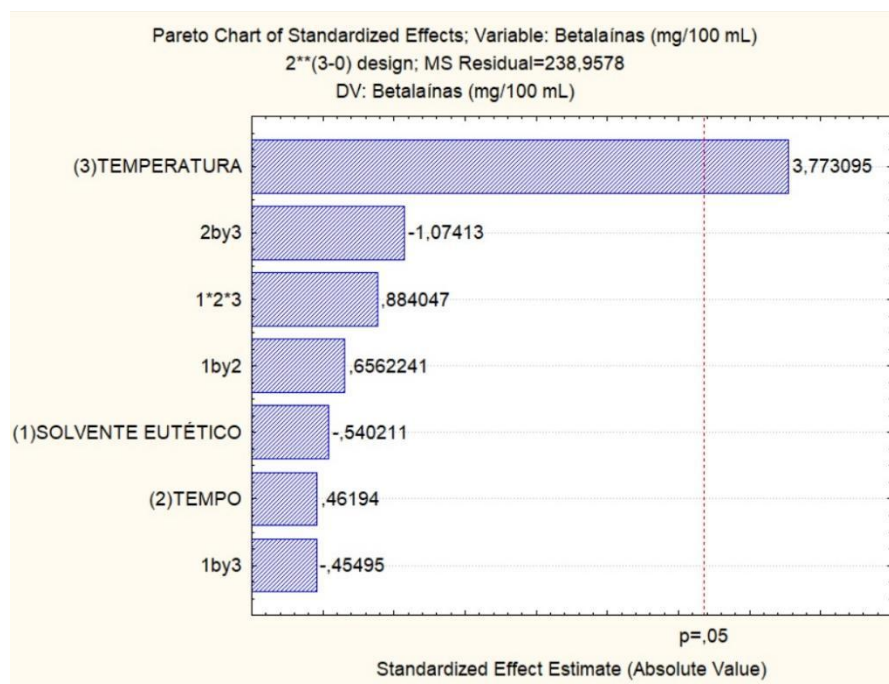
Por outro lado, o coeficiente de determinação (R^2) para as betaxantinas foi de 0,55947, indicando uma baixa relação dos dados experimentais com a curva estabelecida pelo modelo matemático. Dessa forma, somente 55,95% das variações de quantificação das betaxantinas puderam ser explicadas pelos fatores estudados, os outros 44,05% podem ser atribuídos à outros fatores que poderiam ser importantes para conseguir uma maior quantificação de betaxantinas e que não foram considerados no experimento.

O efeito negativo do solvente eutético (X_1) indica que esta variável independente não foi significativa ($p \geq 0,05$). Na Figura 5, é apresentado o gráfico de Pareto dos efeitos em $p \leq 0,05$ na quantificação de betacianinas. Os valores que se localizam à direita da linha tracejada, foram estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$).

Analisando o gráfico de Pareto (Figura 5) observa-se que a temperatura (X_1) foi a variável com efeito positivo mais relevante e estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$). Seguido da interação tempo e temperatura ($X_2 * X_3$) com efeito negativo; interação da solução eutética, tempo e temperatura ($X_1 * X_2 * X_3$) com efeito positivo; a interação entre o solvente eutético e tempo ($X_1 * X_2$) com efeito positivo; o solvente eutético (X_1) com efeito negativo; o tempo (X_2) com efeito positivo e finalmente a interação entre o solvente eutético e a temperatura ($X_1 * X_3$) com efeito negativo. Todos estatisticamente não significativos ($p \geq 0,05$).

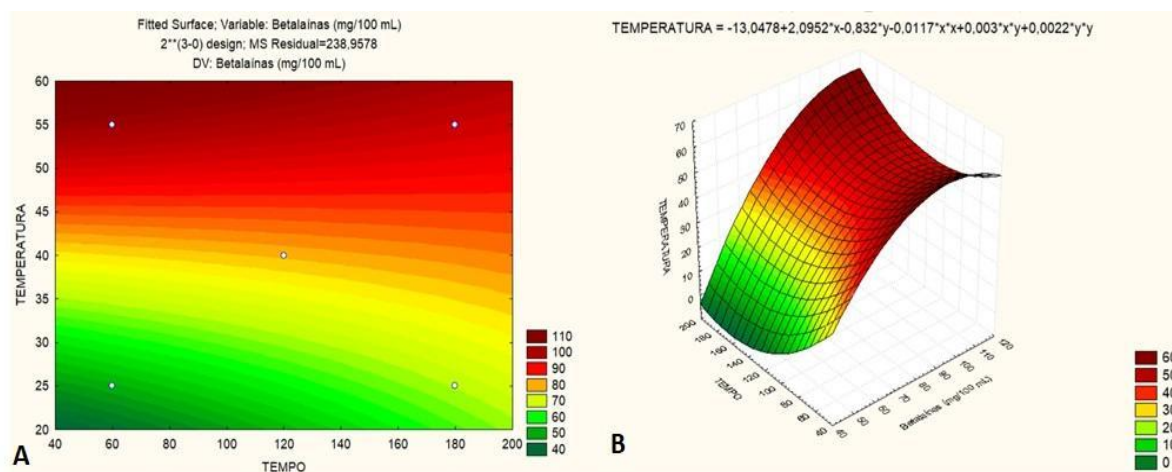
Os gráficos de curvas de nível e de superfície dos efeitos das variáveis independentes na quantificação de betacianinas (Figuras 6 e 7) corroboram com o resultado observado na Figura 5.

Figura 5 - Gráfico de Pareto dos efeitos em $p \leq 0,05$ na quantificação de betacianinas



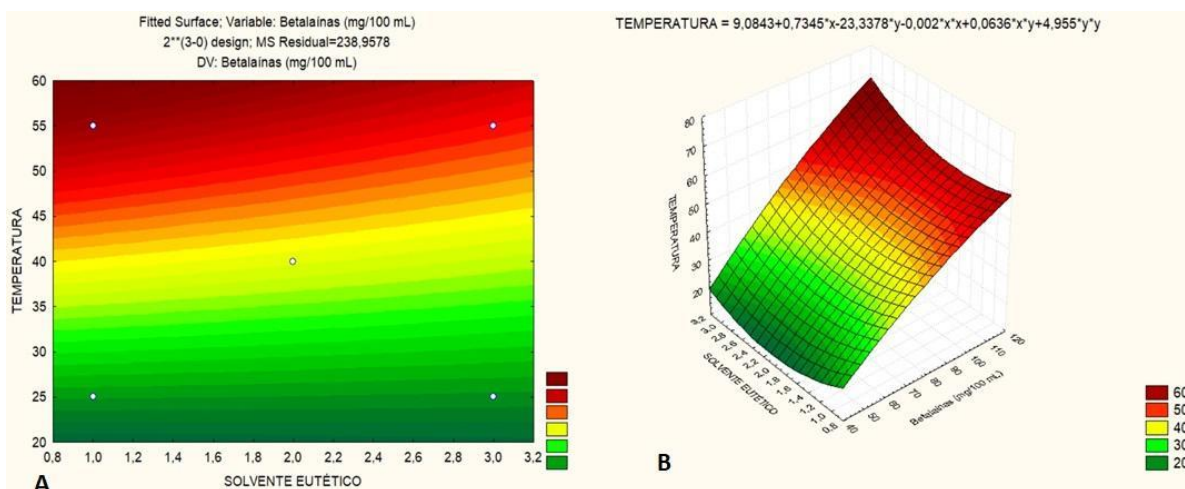
Fonte: Autoria própria (2022)

Figura 6 - Gráfico de curvas de nível (A) e Gráfico de superfície (B) dos efeitos das variáveis independentes na quantificação de betacianinas - Temperatura/Tempo



Fonte: Autoria própria (2022)

Figura 7 - Gráfico de curvas de nível (A) e superfície de resposta (B) dos efeitos das variáveis independentes na quantificação de betacianinas – Temperatura/Solvente eutético

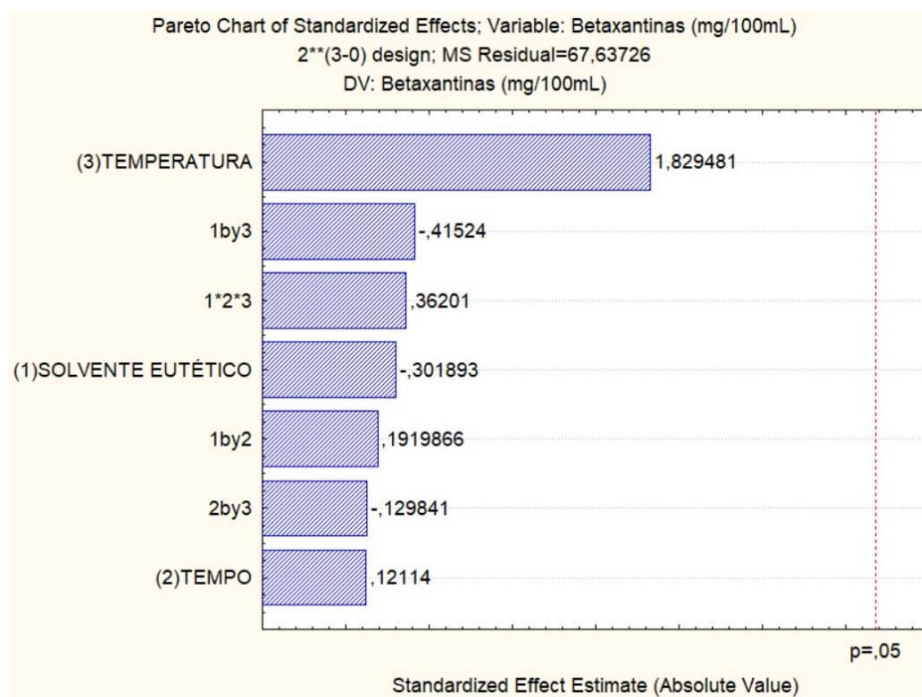


Fonte: Autoria própria (2022)

Na Figura 8, é apresentado o gráfico de Pareto dos efeitos em $p \leq 0,05$ na quantificação de betaxantinas e na Figura 9 e 10 são apresentados os gráficos de curvas de nível dos efeitos das variáveis independentes na quantificação de betaxantinas.

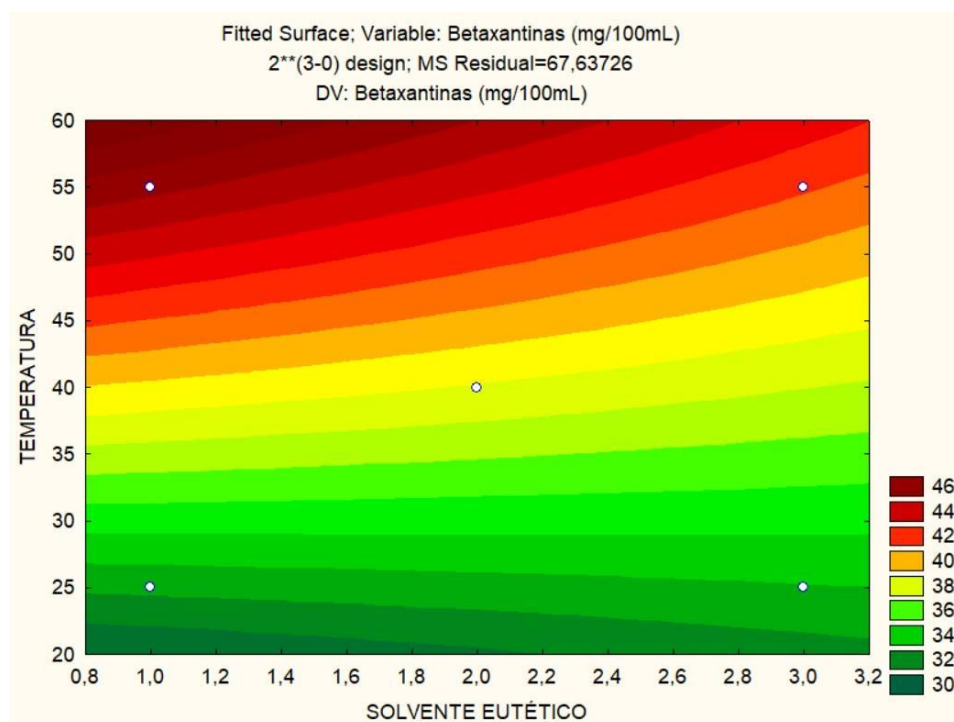
Analisando o gráfico de Pareto da quantificação de betaxantinas (Figura 8) observa-se que os valores não ultrapassam a linha tracejada, portanto, os efeitos das variáveis independentes estudadas foram estatisticamente não significativos ($p \geq 0,05$). De qualquer forma, verifica-se que a temperatura (X_1) foi a variável com efeito positivo mais relevante, assim como na quantificação das betacianinas, seguido da interação do solvente eutético e temperatura ($X_1 * X_3$) com efeito negativo; interação do solvente eutético, tempo e temperatura ($X_1 * X_2 * X_3$) com efeito positivo. O solvente eutético (X_1) apresentou efeito negativo. A interação entre o solvente eutético e o tempo ($X_1 * X_2$) apresentou efeito positivo e a interação do tempo e temperatura ($X_2 * X_3$) apresentou efeito negativo. O efeito positivo menos relevante foi o tempo (X_2).

Figura 8 - Gráfico de Pareto dos efeitos em $p \leq 0,05$ na quantificação de betaxantinas



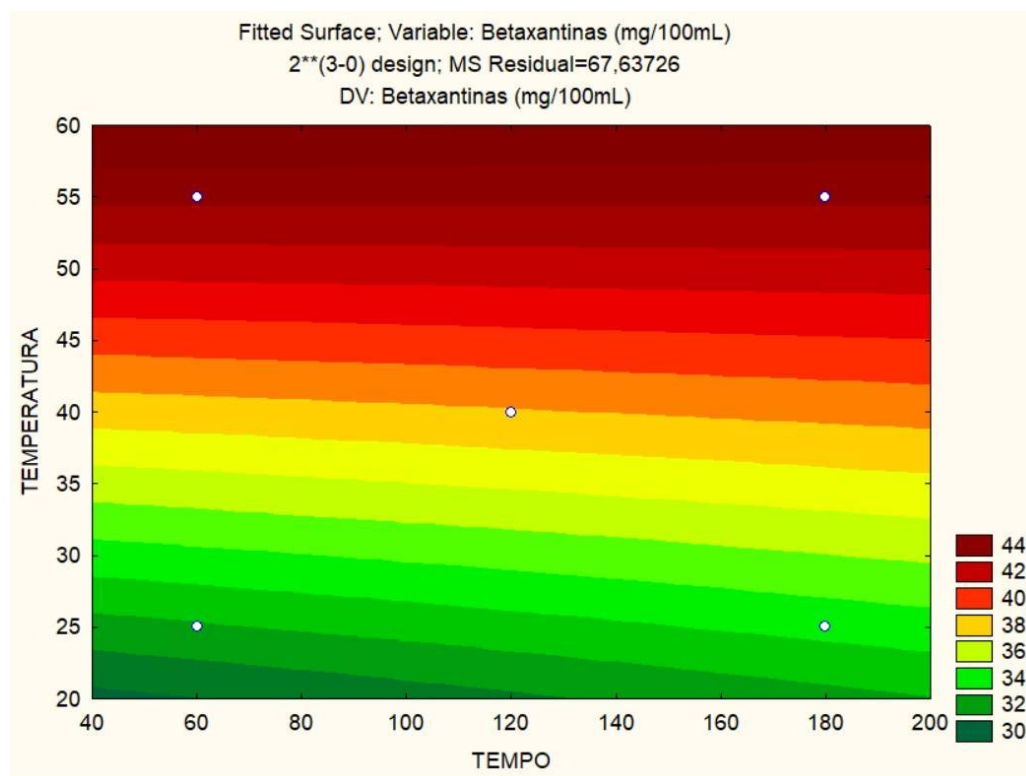
Fonte: Autoria própria (2022)

Figura 9 - Gráfico de curvas de nível e efeitos das variáveis independentes na quantificação de betaxantinas – Temperatura / Solvente eutético



Fonte: Autoria própria (2022)

Figura 10 - Gráfico de curvas de nível e efeitos das variáveis independentes na quantificação de betaxantinas – Temperatura / Tempo



Fonte: Autoria própria (2022)

Apesar do fator solvente eutético não apresentar influência estatisticamente significativa na quantificação das betalaínas, o fator temperatura que apresentou maior influência tem uma ligação direta com a ação do NADES. Estudos revelam que há uma tendência de redução da viscosidade dos NADES com o aumento da temperatura, sugerindo um pré-aquecimento antes da aplicação em processos de extração (HAYYAN *et al.*, 2012; ALOMAR *et al.*, 2016; GHAEDI *et al.*, 2017).

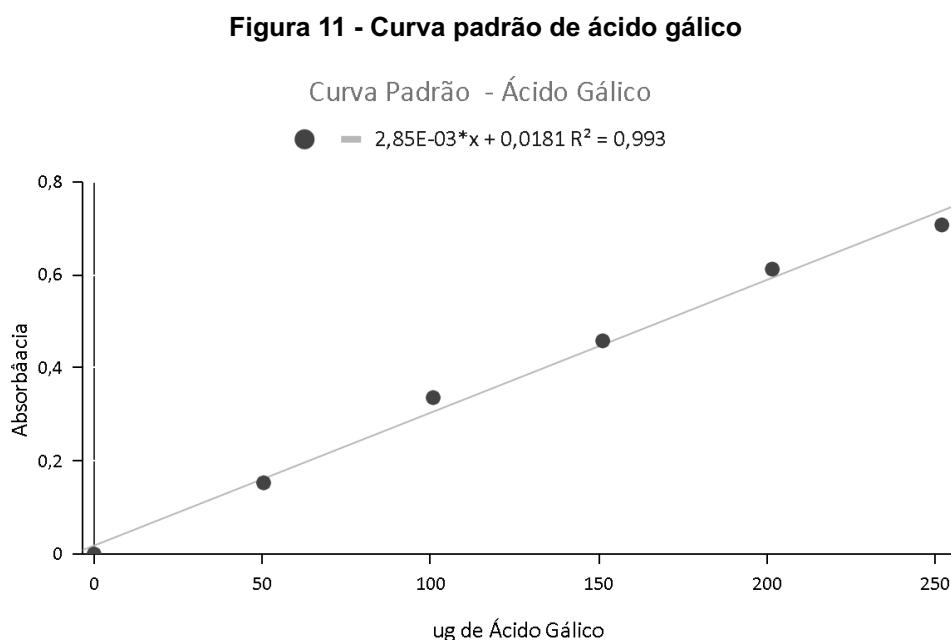
Dessa forma, a melhor condição de extração a uma temperatura de 55 °C pode sugerir que houve uma melhora da interação entre solvente e soluto, facilitando o processo de transferência de massa. Contudo, ainda é necessário cautela com processos envolvendo extração de compostos bioativos e altas temperaturas, visto que podem sofrer degradação quando expostos a altas temperaturas por um tempo prolongado.

5.3 Quantificação dos compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários bioativos, que agem como antioxidantes devido a sua habilidade de doar hidrogênio ou elétrons. Também possuem radicais intermediários estáveis que impedem a oxidação de ingredientes presentes nos alimentos e desempenham um importante papel na inibição de crescimento de patógenos (SINGH *et al.*, 2017).

Os fenólicos são frequentemente extraídos de produtos agroindustriais e incorporados em produtos alimentícios e suplementos. A fim de alcançar um processo biocompatível e ambientalmente saudável, os fenólicos e outros compostos bioativos devem ser extraídos com solventes biocompatíveis e não tóxicos (REBOCHO *et al.*, 2022).

A análise de quantificação dos compostos fenólicos foi realizada apenas na amostra com maior quantidade de betalaínas dentre os resultados do delineamento experimental. Foi construída uma curva padrão de ácido gálico, que apresentou $R^2 = 0,993$, conforme observado na Figura 11.



Fonte: Autoria própria (2022)

O extrato foi obtido a uma temperatura de 55 °C e tempo de 60 minutos, com a utilização do solvente eutético composto por ácido cítrico e sacarose com

fração mássica de 1:1 e 30% de água (m/m). A concentração de compostos fenólicos encontrada foi de 76,4970 μg de GAE. mg^{-1} ou 367,19 μg de GAE. mL^{-1} .

No estudo realizado por John *et al.* (2017), onde também foi utilizado o extrato da casca de beterraba, os valores encontrados foram de 46,53 μg de GAE. mg^{-1} para extração com o solvente acetona e 99,1 μg de GAE. mg^{-1} com o solvente metanol.

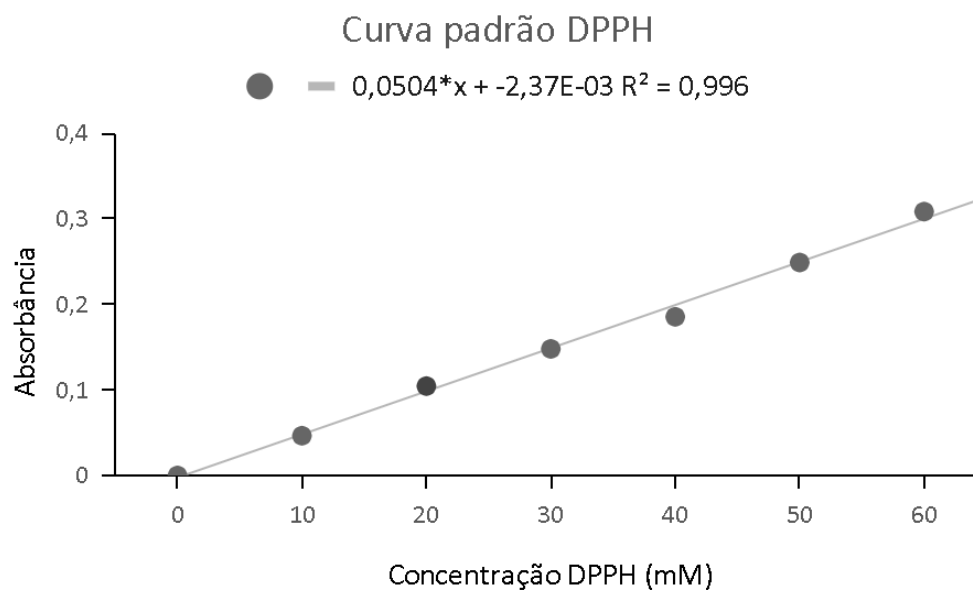
Pazinatto *et al.* (2021), realizaram a extração com a polpa da beterraba sem casca e os resultados encontrados foram 457,45 μg de GAE. mL^{-1} utilizando água como solvente, 299,97 μg de GAE. mL^{-1} com etanol 77% e 386,37 μg de GAE. mL^{-1} com propilenoglicol.

No delineamento experimental proposto por Zin *et al.* (2020), com extratos da casca de beterraba utilizando etanol aquoso como solvente, foi encontrado um valor máximo de 334,46 μg de GAE. mL^{-1} para quantidade total de fenólicos com tempo de 35 min e temperatura a 35 °C. Dessa forma, é possível observar que o solvente utilizado nesse estudo obteve um desempenho satisfatório na extração de compostos fenólicos.

5.4 Avaliação da atividade antioxidante

Assim como a quantificação de compostos fenólicos totais a avaliação da atividade antioxidante foi realizada apenas na amostra com maior quantidade de betalaínas. Foi construída a curva padrão do DPPH, que apresentou um $R^2 = 0,996$, conforme apresentado na Figura 12.

Figura 12 - Curva padrão DPPH



Fonte: Autoria própria (2022)

Os resultados encontrados para cada diluição da amostra foram expressos em porcentagem de inibição ou captura do radical DPPH conforme a Tabela 6.

Tabela 6 - Atividade antioxidante utilizando DPPH

Ensaio	Diluições	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% inibição
1	1:200	4000,840	59,78%
2	1:400	2000,420	58,77%
3	1:800	1000,210	57,77%
4	1:1600	500,105	53,83%
5	1:3200	250,053	53,36%
6	1:6400	125,026	51,35%

Fonte: Autoria própria (2022)

Apesar da grande variação entre as concentrações, as porcentagens de inibição não variaram de forma significativa, o que pode indicar que o potencial antioxidante deste extrato se manteve praticamente estável mesmo em altas diluições. Além disso, o valor de EC_{50} encontrado foi de $5,83 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

John *et al.* (2017), testaram a atividade antioxidante para extratos da casca da beterraba com os solventes metanol e acetona. O extrato com metanol a uma concentração de $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentou porcentagem de inibição de 50,46%,

resultado semelhante ao encontrado neste estudo com a concentração a 125,026 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os extratos com acetona apresentaram 53,36% a uma concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, o mesmo resultado foi encontrado com metade da concentração (250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) utilizando o solvente estudado. Entretanto, a concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato de acetona apresentou 29,80% de porcentagem de inibição.

Observando o estudo de Dias (2019) que testou diversos solventes para extração de betaninas da beterraba e avaliou a atividade antioxidante dos diferentes extratos, pode-se observar que a mudança no solvente escolhido afeta significativamente a porcentagem de inibição. Visto que temperatura e tempo foram fixados em 35 °C e 38 minutos.

Entre os extratos com etanol o melhor resultado foi de 53,09% a uma concentração de 5000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As amostras extraídas com outros solventes na mesma concentração apresentaram uma porcentagem de inibição de: 60,76% com metanol; 61,94% com bicarbonato de sódio; 87,16% com água; 74,79% com etanol e água (1:1); 78,81% com Cloreto de colina (ChCl): ácido cítrico/ água (4:1); 79,30% com ChCl:Ureia/ água (4:1) ; 85,54% com ácido acético e 88,05% com ChCl:glicerol/ água (4:1) (DIAS, 2019).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Analisando os resultados obtidos neste trabalho e os objetivos propostos, é possível concluir que é tecnicamente viável a utilização e preparação do solvente eutético ácido cítrico e sacarose 1:1 e 30% de água (m/m) para o processo de extração de betalaínas da casca de Beterraba (*Beta vulgaris* L. var. *esculenta*).

Diante dos ensaios realizados, foi possível observar que a temperatura é um importante fator a ser analisado e ponderado no processo de extração, visto que temperaturas mais altas oferecem maiores rendimentos, mas podem afetar a estabilidade dos compostos bioativos, que são termossensíveis.

Além disso, o solvente eutético estudado apresentou resultados satisfatórios na quantidade de fenólicos totais e atividade antioxidante, apresentando, inclusive, desempenho superior ou semelhante ao de solventes convencionais e outros compostos como: metanol, acetona, etanol, propilenoglicol e bicarbonato de sódio.

Dessa forma, a casca da beterraba pode ser considerada uma fonte de betalaínas com potencial atividade antioxidante. O que possibilita o aproveitamento desse resíduo e aplicação em diferentes produtos alimentícios.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, A. P. *et al.* Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 29, p. 9142–9147, 2004.
- ABEROUMAND, A. A Review Article on Edible Pigments Properties and Sources as Natural Biocolorants in Foodstuff and Food Industry. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, 6 (1), p. 71-78, 2011.
- ALOMAR, M. K. *et al.* Glycerol-based deep eutectic solvents: Physical properties. **Journal of Molecular Liquids**, v. 215, p. 98–103, 2016.
- ANGUMEENAL, A.; VENKAPPAYYA, D. An overview of citric acid production. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 367–370, 2013.
- AZEREDO, H. M. Betalains: properties, sources, applications, and stability - a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, n. 12, p. 2365–2376, 2008.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 1ª Ed, Campinas - SP, Editora da Unicamp, 412p., 2001.
- BASSI, C. **Consumo certo: dicas para aproveitar o melhor que a beterraba tem a oferecer: o poder da beterraba**. [s.l.;s.n], Ano 1, n. 1, 2014.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, 1995, v. 28, Páginas 25-30.
- BRASIL. ANVISA. **Portaria nº 540/97, de 27 de outubro de 1997 (DOU de 28/10/97)**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. 2002a. Acesso em 02/10/2022.
- BRASIL. ANVISA. **Resolução nº44/77, de 1977 (DOU – Seção I, 01/02/78 e 24/04/78)**. Disponível: <http://www.anvisa.gov.br>. 2002b. Acesso em 02/10/2022.
- BRASIL. ANVISA. **Decreto nº55.871/65 de 26 de março de 1965**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>.2002c. Acesso em 02/10/2022.
- CELLI, G. B.; BROOKS, M. S. Impact of extraction and processing conditions on betalains and comparison of properties with anthocyanins — A current review. **Food Research International**, v. 100, n. 3, p. 501-509, 2017.
- CHEMAT *et al.* Review of Alternative Solvents for Green Extraction of Food and Natural Products: Panorama, Principles, Applications and Prospects. **Molecules**, v. 24, n. 16, p. 3007, 2019.
- CHEN, M.; ZHAO, Y.; YU, S. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of

phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. **Food Chemistry**, v. 172, p. 543–550, 2015.

CHOI, Y. H. *et al.* Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? **Plant Physiology**, v. 156, n. 4, p. 1701–1705, 2011.

CIRILLO, M.A. **Otimização na experimentação: aplicações nas engenharias e ciências agrárias**. 1ª Ed., Lavras - MG: UFLA, 2015, 226p.

CISSÉ, M. *et al.* Aqueous extraction of anthocyanins from Hibiscus sabdariffa: Experimental kinetics and modeling. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 1, p. 16–21, 2012.

CLÍMACO, G. N. **Otimização da extração de compostos bioativos da beterraba por metodologia de superfície de resposta e método de *bootstrap***. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2019.

CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes Alimentícios. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 2, p.203-220, 2002.

CRAVEIRO, R. *et al.* Properties and thermal behavior of natural deep eutectic solvents. **Journal of Molecular Liquids**, v. 215, p. 534–540, 2016.

DAI, Y. *et al.* Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus tinctorius* L. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 13, p. 6272–6278, 2013.

DAI, Y. *et al.* Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. **Analytica Chimica Acta**, v. 766, p. 61–68, 2013a.

DAI, Y. *et al.* Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents in Natural Products Research: Mixtures of Solids as Extraction Solvents. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 11, p. 2162–2173, 2013b.

DAI, Y. *et al.* Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. **Food Chemistry**, v. 187, p. 14–19, 2015.

DALLA COSTA, A. P. **Aproveitamento de resíduos de cenoura e beterraba da indústria minimamente processados para elaboração de ingredientes funcionais**. Dissertação de Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

DALL MOLIN, B. **Obtenção e caracterização de filmes de amido termoplástico (tps) adicionado de nanocelulose pela técnica casting film utilizando natural deep eutectic solvents (nades)**. Trabalho de conclusão de curso de graduação em Engenharia de alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo

Mourão, 2022.

DIAS, A. C. S.; DEMUNER, A. J.; SOUSA, R. C. S. **Extração de betanina em beterraba (*Beta vulgaris*) utilizando solventes alternativos e avaliação da atividade antioxidante**. Dissertação de Mestrado em Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa, 2019.

FARIDAH, A.; HOLINESTI, R.; SYUKRI, D. Betalains from Red Pitaya Peel (*Hylocereus polyrhizus*): Extraction, Spectrophotometric & HPLC-DAD Identification, Bioactivity & Toxicity Screening. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 14, n. 12, p. 976-982, 2015.

FARRÁN, A. *et al.* Green Solvents in Carbohydrate Chemistry: From Raw Materials to Fine Chemicals. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 14, p. 6811–6853, 2015.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. A.; ALMELA, L. Application of high-performance liquid chromatography to the characterization of the betalain pigments in prickly pear fruits. **Journal of Chromatography A**, v. 913, n. 1-2, p. 415–420, 2001.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R. D.; SILVA, F. D. C. D. Green Chemistry, Sustainable Economy and Quality of Life. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 1, 2014.

GARCÍA, A. *et al.* Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESs). **Food Chemistry**, v. 197, p. 554–561, 2016.

GHAEDI, H. *et al.* The study on temperature dependence of viscosity and surface tension of several Phosphonium-based deep eutectic solvents. **Journal of Molecular Liquids**, v. 241, p. 500–510, 2017.

GUEDES, V. A. P. S. ***Phytolacca americana* L.: potencial das bagas de uma planta invasora**. Dissertação de Mestrado em Controle de Qualidade, Universidade do Porto, Porto, 2015.

HAYYAN, A. *et al.* Fruit sugar-based deep eutectic solvents and their physical properties. **Thermochimica Acta**, v. 541, p. 70–75, 2012.

HUANG, H-W. *et al.* Advances in the extraction of natural ingredients by high pressure extraction technology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 33, n. 1, p. 54–62, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - **IBGE. Censo Agropecuário**, p.1-777, Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/51/agro_2006.pdf>

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - **IBGE. Censo Agropecuário**, p.1-109, . Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3096/agro_2017_resultados_definitivos.pdf>

JOHN, S. *et al.* Antioxidant and antibacterial activities of beta vulgaris L. peel extracts. **International Journal of Pharma Research and Health Sciences**, v. 5, n. 6, p. 1974-79, 2017.

KAIMAINEN, M. **Stability of Natural Colorants of Plant Origin**. 2014. Doctoral theses in food sciences. University of Turku. Turku, Finland, 2014. ISBN 978-951-29-5963-1

KHAN, M. I. Plant Betalains: Safety, Antioxidant Activity, Clinical Efficacy, and Bioavailability. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 2, p. 316–330, 2015.

KHURI, A. I.; MUKHOPADHYAY, S. Response surface methodology. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v. 2, n. 2, p. 128–149, 2010.

KORETSKY, M.D. **Engineering and Chemical Thermodynamics**. 2nd Edition, John Wiley & Sons, Inc. United States, 710p., 2013.

KUGLER, F.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. Characterisation of betalain patterns of differently coloured inflorescences from *Gomphrena globosa* L. and *Bougainvillea* sp. by HPLC–DAD–ESI–MS n. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 387, n. 2, p. 637-648, 2007.

MANHANI, T. M. *et al.* Sacarose, Suas Propriedades e os Novos Edulcorantes. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 17, n. 1, p. 113, 2014.

MARAN, J. P.; MANIKANDAN, S. Response surface modeling and optimization of process parameters for aqueous extraction of pigments from prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit. **Dyes and Pigments**, v. 95, n. 3, p. 465-472, 2012.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. Tradução . [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2013.

NILSSON, T. Studies Into The Pigments In Beetroot (*Beta vulgaris* L. Ssp. *vulgaris* Var. *rubra* L.). **Lantbrukshögskolans Annaler**, v. 36, p. 179-219, 1970.

NIRMAL, N. P.; MEREDDY, R.; MAQSOOD, S. Recent developments in emerging technologies for beetroot pigment extraction and its food applications. **Food Chemistry**, v. 356, p.129611, 2021.

NOVAES, C. G. *et al.* Optimization of Analytical Methods Using Response Surface Methodology - Part I: Process Variables. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1184–1215, 2017.

OETTERER, M; SARMENTO, S. B. S. **Propriedades dos açúcares**. In: *Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos* [S.l: s.n.], 2006.

PAIVA, A. *et al.* Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 2, n. 5, p. 1063–1071, 2014.

PAZINATTO, B. C.; TEIXEIRA MARQUES, D.; DE LIMA, C. P. Avaliação da atividade antioxidante e compostos bioativos presentes em extratos de beterraba: determinação de fenólicos de extratos de beterraba. **Cadernos da Escola de Saúde**, v. 21, n. 1, 18 jul. 2022.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L. D.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada?. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 106–110, 2005.

PERIN, E. C. *et al.* ABA-dependent salt and drought stress improve strawberry fruit quality. **Food Chemistry**, v. 271, p. 516–526, 2019.

PINHEIRO, J.B. **Nematóides na cultura da beterraba**. Embrapa, Hortaliças. Circular Técnica, 85. Brasília, 2011. ISSN 1415-3033. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/883594>>

POLTURAK, G.; AHARONI, A. “La Vie en Rose”: Biosynthesis, Sources, and Applications of Betalain Pigments. **Molecular Plant**, v. 11, n. 1, p. 7–22, 2018.

REBOCHO, S. *et al.* Fractionated extraction of polyphenols from mate tea leaves using a combination of hydrophobic/ hydrophilic NADES. **Current research in food science**, v. 5, p. 571-580, 2022.

RIEGEL, I. *et al.* Análise termogravimétrica da pirólise da acácia-negra (*Acacia mearnsii* de Wild.) cultivada no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Árvore**, v. 32, n. 3, p. 533–543, 2008.

RORIZ, C. L. *et al.* *Gomphrena globosa* L. como fonte de corantes naturais: caracterização em betacianinas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. SP, p.151-154, 2017.

RUMBAOA, R. G. O.; CORNAGO, D. F.; GERONIMO, I. M. Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine potato (*Solanum tuberosum*) tubers. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 6, p. 546–550, 2009.

SANTOS, C. D. **Extração, clarificação e estabilização de betalainas provenientes de talos de beterraba vermelha (*Beta vulgaris* L.)**. Tese de Doutorado em Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

SAVI, L. K. **Desenvolvimento de solventes eutéticos naturais profundos (NADES) e o estudo de suas propriedades físico-químicas, térmicas e reológicas**. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

SCHIOZER, A. L.; BARATA, L. E. S. Estabilidade de corantes e pigmentos de origem vegetal. **Revista Fitos**, [S.l.], v. 3, n. 02, p. 6-24, 2007.

SILVA, J. P. P. *et al.* Ultrasound-assisted extraction of red beet pigments (*Beta vulgaris* L.): Influence of operational parameters and kinetic modeling. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 10, p. e14762, 2020.

SINGH, B.; SINGH, J.P.; KAUR, A.; SINGH, N. Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. **Food Research International**, v. 101, p. 1–16, 2017.

TADINI, C. C. **Operações Unitárias na Indústria de Alimentos - Vol. 2.** [Rio de Janeiro: LTC]: Grupo GEN, 2016. 9788521632689. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521632689/>.

TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 733–749, 2008.

TIVELLI, S.W. *et al.* **Beterraba: do plantio à comercialização.** Campinas: Instituto Agrônômico, v. 210, p. 45. Série Tecnologia APTA. Boletim Técnico IAC, 2011. Versão on-line. Disponível em: http://www.iac.sp.gov.br/publicacoes/publicacoes_online/pdf/bt_210.pdf

TRANI, P. E.; FORNASIER, J. B.; LISBÃO, R. S. Nutrição e adubação da beterraba. In: FERREIRA, M. E.; CASTELLANE, P. D.; CRUZ, M. C. P. (Eds.). **Nutrição e adubação de hortaliças.** Piracicaba: Associação Brasileira para pesquisa da potassa e do fosfato, p. 429-446, 1993.

ÜNLÜ, A. E.; ARIKAYA, A.; TAKAÇ, S. Use of deep eutectic solvents as catalyst: A mini-review. **Green Processing and Synthesis**, v. 8, n. 1, p. 355–372, 2019.

VITTI, M. C. D. *et al.* Comportamento da beterraba minimamente processada em diferentes espessuras de corte. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 623–626, 2003.

VOLP, A. C. P. *et al.*, Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição**, v.20, n.1, p. 157-166, 2009.

WANG, L.-T. *et al.* Recyclable menthol-based deep eutectic solvent micellar system for extracting phytochemicals from Ginkgo biloba leaves. **Journal of Cleaner Production**, v. 244, p. 118648, 2020.

YANG, M. *et al.* Determination of acetaminophen's solubility in poly (ethylene oxide) by rheological, thermal and microscopic methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1-2, p. 83–89, 2011.

YANG, Z. Natural Deep Eutectic Solvents and Their Applications in Biotechnology. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology.* Springer, Berlin, Heidelberg, 2018. p. 1-29.

ZHRINA, I. *et al.* Deacidification of palm oil using betaine monohydrate-based natural deep eutectic solvents. **Food Chemistry**, v. 240, p. 490–495, 2018.

ZIN, M.N.; BÁNVÖLGYI, M and Sz. Conventional extraction of betalains compounds from beetroot peels with aqueous ethanol solvent. **Acta Alimentaria**, v. 49 (2), p. 163-169, 2020.

ZIN, M. M. *et al.* Betalains, total polyphenols, and antioxidant contents in red beetroot peel (*Cylindra type*). **Progress In Agricultural Engineering Sciences**, v. 16 (S2). p. 27-36, 2020.