

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA
BAHIA *campus* PORTO SEGURO**
Licenciatura em Química

**EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR CLAE-DAD DE
METILXANTINAS EM CACAU EM PÓ COMERCIAL: AVALIANDO O
POTENCIAL EXTRATIVO DE SOLVENTES EUTÉTICOS**

JUAN FELIPE DE SOUZA SAMPAIO

Porto Seguro (BA)
2024

JUAN FELIPE DE SOUZA SAMPAIO

**EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR CLAE-DAD DE
METILXANTINAS EM CACAU EM PÓ COMERCIAL: AVALIANDO O
POTENCIAL EXTRATIVO DE SOLVENTES EUTÉTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia (IFBA), *campus* Porto Seguro, como requisito parcial à obtenção do título de Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luciano da Silva Lima

Porto Seguro (BA)
2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS DO IFBA, COM OS
DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

S192e Sampaio, Juan Felipe de Souza

Extração e quantificação por CLAE-DAD de metilxantinas em
cacau em pó comercial: avaliando o potencial extrativo de solventes
eutéticos / Juan Felipe de Souza Sampaio – Porto Seguro, 2024.
24 f. : il.

Orientador: Dr. Luciano da Silva Lima.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) –
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia,
2024.

1. Solventes. 2. Extração por solventes. 3. Compostos
bioativos das plantas. 4. Química verde. I. Título.

CDD 541.3482

FOLHA DE APROVAÇÃO

JUAN FELIPE DE SOUZA SAMPAIO

EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR CLAE-DAD DE METILXANTINAS EM CACAU EM PÓ COMERCIAL: AVALIANDO O POTENCIAL EXTRATIVO DE SOLVENTES EUTÉTICOS

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial à obtenção do título de Licenciado em Química, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia (IFBA), Campus Porto Seguro, pela seguinte Banca examinadora:

Professor Orientador: Luciano da Silva Lima

Professor Avaliador: Wellington Correia de Carvalho

Professora Avaliadora: Juliana de Oliveira Santos

Porto Seguro, 18 de setembro de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **WELLINGTON CORREIA DE CARVALHO, Professor(a) do Ensino Básico, Técnico e Tecnológico**, em 19/09/2024, às 01:47, conforme decreto nº 8.539/2015.



Documento assinado eletronicamente por **LUCIANO DA SILVA LIMA, Professor(a) do Ensino Básico, Técnico e Tecnológico - EBTT**, em 19/09/2024, às 14:30, conforme decreto nº 8.539/2015.



Documento assinado eletronicamente por **Juliana de Oliveira Santos, Professor do Ensino Básico, Técnico e Tecnológico - Substituto**, em 23/09/2024, às 08:05, conforme decreto nº 8.539/2015.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site http://sei.ifba.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&acao_origem=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0 informando o código verificador **3732168** e o código CRC **4E2C5509**.

RESUMO

Em meio ao estudo da composição química e propriedades medicinais das plantas ainda existem muitas espécies que não foram investigadas. Nesse cenário, o sul da Bahia apresenta grande parte de sua área coberta pela Mata Atlântica e possui inúmeras plantas com potencial bioativo, sendo o *Theobroma cacao* um potencial fornecedor de substâncias com efeitos terapêuticos no tratamento de enfermidades. As técnicas convencionais para a extração dessas substâncias empregam solventes orgânicos voláteis como clorofórmio, etanol, metanol, hexano, propanol e, em geral, apesar de serem eficientes nestes processos, podem apresentar grande toxicidade, inflamabilidade e ou custo elevado. Face ao exposto, os solventes eutéticos, também conhecidos como solventes verdes, se apresentam como opção. Esses solventes são muitas vezes formados por materiais sólidos com elevados pontos de fusão, que resultam em uma mistura líquida à temperatura ambiente. Além de apresentarem grande capacidade de extrair compostos químicos bioativos, também oferecerem, baixo custo de produção, baixos pontos de fusão e ebulição, e do ponto de vista sustentável, apresentam baixa toxicidade, baixa volatilidade e elevada biodegradabilidade, reduzindo o impacto ambiental. Nesse contexto, esse estudo tem como objetivo avaliar o potencial extrativo de solventes verdes pela extração de Cafeína, Teobromina e Teofilina de uma amostra comercial de cacau em pó, em comparação com métodos de extrações convencionais. Os solventes eutéticos foram preparados por um método de aquecimento com agitação em condições específicas. Tendo como aceitador de hidrogênio o cloreto de colina e como doadores de ponte de hidrogênio o ácido tartárico e a ureia; a caracterização foi feita a partir da Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier, o procedimento envolveu a diluição dos precursores dos solventes eutéticos em acetonitrila. Ainda nos procedimentos, os extratos de cacau em pó dos diferentes solventes foram submetidos a uma etapa inicial de pré-tratamento para separar a fase sólida, utilizando um cartucho de C18 e em seguida, à uma análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) para quantificar as metilxantinas e comparar as extrações. Como resultado, a síntese e a caracterização dos solventes eutéticos foram bem sucedidas, além disso, ambos se mostraram eficazes, superando o desempenho dos solventes à base de etanol e metanol, sendo destaque, o solvente à base de cloreto de colina e ureia. Desse modo, demonstram a grande capacidade de extração dos solventes verdes no processo de obtenção das metilxantinas, podendo ser uma alternativa mais limpa e eficiente aos solventes convencionais tóxicos.

Palavras-chave: solventes verdes, cromatografia líquida, compostos bioativos

ABSTRACT

Extraction and Quantification of Methylxanthines in Commercial Cocoa Powder by HPLC-DAD: Evaluating the Extractive Potential of Eutectic Solvents

In the midst of studying the chemical composition and medicinal properties of plants, there are still many species that have not been investigated. In this context, southern Bahia has much of its area covered by the Atlantic Forest and contains numerous plants with bioactive potential, with *Theobroma cacao* being a potential source of substances with therapeutic effects in the treatment of diseases. Conventional techniques for extracting these substances use volatile organic solvents such as chloroform, ethanol, methanol, hexane, and propanol. Despite their efficiency in these processes, they may exhibit high toxicity, flammability, and/or high costs. Given this, eutectic solvents, also known as green solvents, present themselves as an alternative. These solvents are often formed by solid materials with high melting points, which result in a liquid mixture at room temperature. In addition to their high capacity to extract bioactive chemical compounds, they also offer low production costs, low melting and boiling points, and, from a sustainability perspective, they have low toxicity, low volatility, and high biodegradability, reducing environmental impact. In this context, this study aims to evaluate the extraction potential of green solvents for the extraction of caffeine, theobromine, and theophylline from a commercial cocoa powder sample, compared to conventional extraction methods. The eutectic solvents were prepared using a heating method with stirring under specific conditions. Choline chloride was used as the hydrogen bond acceptor, and tartaric acid and urea were used as the hydrogen bond donors. The characterization was performed using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), and the procedure involved diluting the eutectic solvent precursors in acetonitrile. Additionally, the cocoa powder extracts from different solvents underwent an initial pre-treatment step to separate the solid phase using a C18 cartridge, followed by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection (HPLC-DAD) to quantify the methylxanthines and compare the extractions. As a result, the synthesis and characterization of the eutectic solvents were successful, and both proved effective, outperforming ethanol- and methanol-based solvents. Particularly, the choline chloride and urea-based solvent stood out. Thus, the green solvents demonstrated a strong extraction capacity in the process of obtaining methylxanthines, potentially offering a cleaner and more efficient alternative to toxic conventional solvents.

Keywords: green solvents, liquid chromatography, bioactive compounds

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Estrutura molecular das metilxantinas..... | 5 |
| Tabela 2 - Fase móvel a ser empregada na análise por CLAE..... | 13 |
| Tabela 3 - Especificações da coluna..... | 13 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Cacau em meio a Mata Atlântica..... | 4 |
| Figura 2 - Alguns dos principais precursores de solventes eutéticos..... | 7 |
| Figura 3 - Síntese dos solventes eutéticos (DES)..... | 11 |
| Figura 4 - Preparo dos extratos..... | 11 |
| Figura 5 - Quantificação dos extratos por CLAE-DAD..... | 13 |
| Figura 6 - Solventes eutéticos sintetizados e suas temperaturas de fusão..... | 15 |
| Figura 7 - Espectro no infravermelho dos DES e seus precursores..... | 16 |
| Figura 8 - Cromatograma dos padrões frente ao gradiente empregado; tempo de retenção: teobromina (3,00 minutos), teofilina (4,30 minutos) cafeína (7,00 minutos) | 16 |
| Figura 9 - Estudo da linearidade: curva exploratória (1 - 29 ug/mL)..... | 17 |
| Figura 10 - Curvas de calibração (Teobromina: 6 - 18 ug/mL) e (Cafeína: 1 - 5 ug/mL)..... | 17 |
| Figura 11 - Concentrações e leituras dos extratos por CLAE-DAD (mAU = intensidade)..... | 18 |
| Figura 12 - Comparação entre o mix de padrões e a adição de metilxantinas nos extratos. (add = adição de)..... | 19 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------|--|
| ATR | Reflectância Total Atenuada, do inglês Attenuated Total Reflectance |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| CLAE-DAD | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodo |
| DES | Solventes eutéticos profundos, do inglês <i>deep eutectic solvent</i> |
| EAU | Extração assistida por ultrassom |
| FM | Fase móvel |
| FT | Transformada de Fourier |
| FTIR | Infravermelho por transformada de Fourier, do inglês Fourier Transform Infrared Spectroscopy |
| HBA | Aceitadores de ligação de hidrogênio, do inglês Hydrogen Bond Acceptor |
| HBD | Doadores de ligação de hidrogênio, do inglês Hydrogen Bond Donor |
| ODS | Objetivos de Desenvolvimento Sustentável |
| ONU | Organização das Nações Unidas |
| RDC | Resolução da Diretoria Colegiada |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 OBJETIVO..... | 3 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 3 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 3 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA..... | 4 |
| 3.1 O CACAUEIRO E SEUS DERIVADOS..... | 4 |
| 3.2 METILXANTINAS..... | 5 |
| 3.5 INFRAVERMELHO E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA..... | 9 |
| 4. MATERIAS E MÉTODOS..... | 11 |
| 4.1 PREPARO DOS SOLVENTES EUTÉTICOS..... | 11 |
| 4.2 CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO..... | 11 |
| 4.3 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM..... | 12 |
| 4.4 ANÁLISE POR CLAE-DAD..... | 12 |
| 4.5 PARÂMETROS PARA A VALIDAÇÃO E TRATAMENTO DOS DADOS..... | 13 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 15 |
| 5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS SOLVENTES VERDES..... | 15 |
| 5.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA..... | 16 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 21 |
| REFERÊNCIAS..... | 22 |

1 INTRODUÇÃO

O *Theobroma cacao* está presente na região Sul e Extremo sul da Bahia, Brasil e contribui para a preservação do bioma Mata Atlântica que em troca oferece sombra e umidade favorecendo a produção do seu fruto, o cacau (Parque das Aves, 2022). Apesar da espécie não ser nativa da Mata Atlântica, está totalmente adaptada sendo responsável por décadas no desenvolvimento econômico dessas regiões. O *Theobroma cacao* pode representar uma imensa virtude na geração de novas drogas pois são fornecedoras de substâncias com efeitos terapêuticos no tratamento de enfermidades (Da Rocha *et al.*, 2021).

Os derivados do cacau são conhecidos por serem ricos em metilxantinas. Essa classe de compostos é biologicamente ativa e pode ser encontrada de forma natural em muitos alimentos e bebidas. Essas substâncias podem ter efeitos fisiológicos semelhantes no corpo, tais como estimular o sistema nervoso central. No cacau, a teobromina é a metilxantina encontrada em maior concentração (Ferreira, 2013).

Dentre as técnicas mais utilizadas para obtenção de constituintes químicos estão a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida por solventes. Estas técnicas, chamadas normalmente de convencionais, empregam solventes orgânicos voláteis como clorofórmio, etanol, metanol, hexano, acetato de etila, acetona, propanol ou suas misturas e, em geral, apesar de serem eficientes nestes processos podem apresentar grande toxicidade, inflamabilidade, custo elevado e longo tempo para a extração (Bubalo *et al.*, 2016).

Outro ponto a se considerar é a Química Verde que almeja a viabilização de processos mais eficientes e ambientalmente corretos, ou seja, busca evitar ou minimizar o impacto negativo gerado pelas ações antrópicas ao meio ambiente. Dentre os seus objetivos temos o aumento da segurança dos procedimentos e a redução da emissão de substâncias tóxicas, sendo uma linha de pesquisa diretamente relacionada com formulação de tecnologias mais sustentáveis, como por exemplo, solventes menos nocivos ao meio ambiente (Aguiar *et al.*, 2014 *apud* Anastas 2002).

Face ao exposto, surge o desenvolvimento e utilização de solventes eutéticos com o objetivo de substituir os solventes tóxicos comumente utilizados na extração de constituintes químicos de vegetais. Esses solventes muitas vezes são formados por materiais sólidos com elevados pontos de fusão, que resultam em uma mistura

líquida à temperatura ambiente. Além da grande capacidade de extrair substâncias de diferentes polaridades, o que os tornam versáteis para a obtenção de compostos químicos bioativos, também apresentam, baixo custo de produção, baixos pontos de fusão e ebulição. Do ponto de vista sustentável, esses solventes verdes se destacam pela baixa toxicidade, baixa volatilidade e elevada biodegradabilidade gerando menos poluentes e resíduos, o que contribui significativamente para a redução do impacto ambiental ao final do processo (Ruesgas-Ramón; Figueroa Espinoza; Durand, 2017; Lomba *et al.*, 2021).

Desse modo, os estudos das composições químicas e propriedades medicinais de plantas são de grande interesse e o surgimento de novas doenças impulsiona a necessidade de novos fármacos, sendo essa área de estudo de suma importância no desenvolvimento de protótipos de novas drogas (Filho; Yunes, 1998). Junto a isso, visando uma redução no impacto ambiental, surge a necessidade de viabilizar extrações mais sustentáveis dos compostos presentes em espécies vegetais no geral.

Outro impulsionador são os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), que apresenta uma agenda a ser cumprida até 2030, proposta pela ONU aos seus países membros. Essa agenda é composta por 17 objetivos de desenvolvimento sustentável, sendo que o presente trabalho atende dois desses: o Objetivo 9 e o 12.

O objetivo 9: Indústria, inovação e infraestrutura; apresenta como um dos seus pontos a modernização e reabilitação das indústrias tornando-as sustentáveis, com a utilização de tecnologias e processos industriais limpos e ambientalmente corretos, sendo a pesquisa científica de suma importância para que as metas sejam atingidas. Já o objetivo 12: Consumo e produção responsáveis, dentre suas pretensões, almeja alcançar o uso eficiente de recursos naturais e reduzir significativamente a liberação de produtos químicos no ar, água e solo, minimizando os impactos negativos sobre o meio ambiente e a saúde humana (ONU Brasil, 2024).

Nesse contexto, o objetivo deste estudo é sintetizar, caracterizar e avaliar o potencial extrativo de solventes verdes (eutéticos) na extração de metilxantinas (Teobromina, Teofilina e Cafeína) em uma amostra comercial de cacau em pó, avaliando também, a eficiência do uso de solventes eutéticos frente aos métodos convencionais comumente utilizados.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial extrativo de solventes eutéticos pela extração das metilxantinas presentes no cacau em pó comercial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar solventes verdes (eutéticos) a base de cloreto de colina;
- Caracterizar esses solventes;
- Desenvolver processos extrativos assistidos por ultrassom dos constituintes químicos (metilxantinas) do cacau em pó comercial pela utilização de solventes previamente preparados e com etanol e metanol;
- Desenvolver metodologia para a quantificação das metilxantinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD);

3 REVISÃO DA LITERATURA

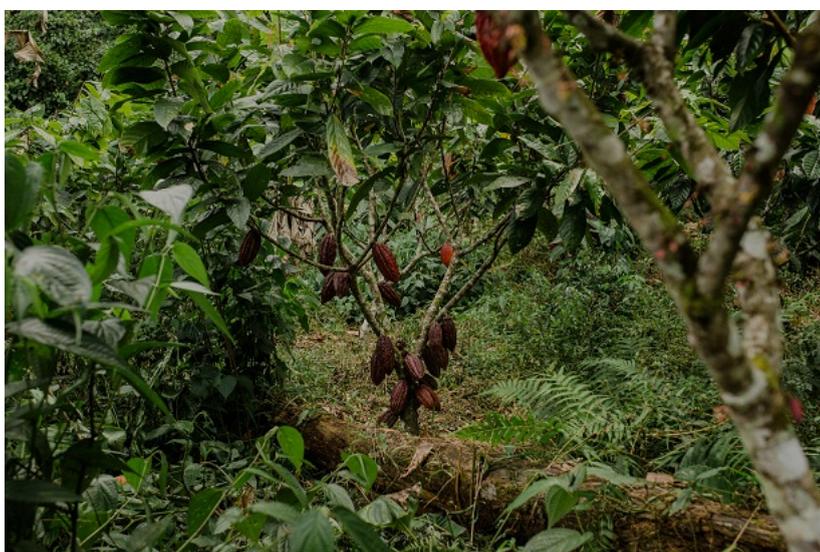
3.1 O CACAUEIRO E SEUS DERIVADOS

A árvore do cacau cujo nome científico é *Theobroma cacao* pertence à família *Malvaceae*, cresce nas regiões da América Central, América do Sul, África e algumas ilhas do oeste da Índia (Ferreira, 2013 *apud* Paoletti *et al.*, 2012).

No sul da Bahia o precursor do chocolate é cultivado frequentemente de maneira peculiar, a denominada cabruca, que é uma forma de plantar o cacau dentre as árvores da Mata Atlântica. Esse método de plantio surgiu no sul da Bahia, migrando posteriormente para outras regiões do país que também produzem cacau. De acordo com o decreto de nº 15180, de 02 de janeiro de 2014 do estado da Bahia, para ser considerado um sistema de cabruca é necessário que a plantação esteja inserida junto a, pelo menos, 20 espécies de árvores nativas por hectare (Parque das Aves, 2022).

A ideia surgiu não apenas pela necessidade de sombra e umidade para o bom desenvolvimento do cacau e de seus frutos (Figura 1), mas também devido à sua sensibilidade às mudanças climáticas. Assim, a cabruca logo se mostrou um mecanismo importante na proteção do bioma da Mata Atlântica, sendo um sistema agroflorestal positivo para conservação de muitas espécies de árvores, servindo como corredores ecológicos para animais e ajudando na regulação do fluxo hídrico (Parque das Aves, 2022).

Figura 1 - Cacau em meio a Mata Atlântica



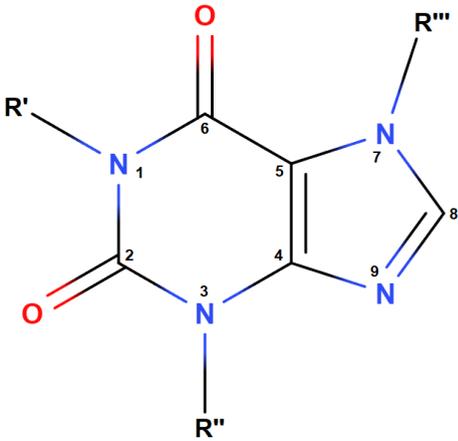
Fonte: Acervo Tabôa, Analee (2024).

O fruto do cacau e os seus derivados são conhecidos por serem ricos em metilxantinas como: cafeína, teobromina e teofilina. Esses compostos são alcalóides derivados da purina, ocorrendo-se naturalmente em produtos derivados do cacau, pertencendo ao grupo de compostos químicos conhecidos como metilxantinas, sendo esses, compostos biologicamente ativos. Essas substâncias podem ter efeitos fisiológicos semelhantes no corpo como, por exemplo, estimular o sistema nervoso central, o músculo cardíaco e o músculo esquelético, além de possuírem um potencial efeito diurético. No cacau, a teobromina é a metilxantina encontrada em maior concentração, seguida da cafeína, enquanto a teofilina é frequentemente presente em concentrações menores e, por vezes, não é detectada (Ferreira, 2013).

3.2 METILXANTINAS

O termo metilxantina corresponde a classe de substâncias estimulantes mais consumidas no mundo. Derivados da base purina, esses compostos bioativos são obtidos a partir do metabolismo secundário de plantas como o *Theobroma cacao*, a *Paullinia cupana* e o *Coffea canephora*, sendo exemplos dessas substâncias a cafeína, a teofilina e a teobromina, conforme as estruturas moleculares apresentadas na Tabela 1 (Lima, 2014; Jankech *et al.*, 2019 *apud* de Mejia; Ramirez-Mares, 2014).

Tabela 1 - Estrutura molecular das metilxantinas

| Estrutura molecular | Substituinte | | | |
|---|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Composto | R' | R'' | R''' |
|  | Cafeína | CH ₃ | CH ₃ | CH ₃ |
| | Teobromina | H | CH ₃ | CH ₃ |
| | Teofilina | CH ₃ | CH ₃ | H |

Elaborado por Sampaio (2024)

Esses compostos são derivados da purina que é um heterocíclico nitrogenado não substituído, ou seja, sem as ramificações nos nitrogênios das posições (1, 3 e 7)

e sem as duas carbonilas, a qual dá origem a diferentes xantinas. Além disso, pode-se observar que esses compostos derivados da purina são muito semelhantes e se diferem apenas nos substituintes (R). Enquanto a Cafeína apresenta três metilas (CH_3) como substituintes, a Teobromina e a Teofilina são isômeros estruturais que apresentam duas metilas e um hidrogênio, tendo como diferença apenas as posições **R'** e **R'''**. Essas variações alteram o efeito biológico de cada metilxantina (Santin, 2018 *apud* Johnson *et al.*, 2012).

Essas substâncias estão presentes em inúmeros produtos alimentícios e em uma variedade de medicamentos. No corpo humano, agem estimulando o sistema nervoso central. A Cafeína, quando ingerida, é rapidamente absorvida para a corrente sanguínea, distribuindo-se em todo o organismo. Com a capacidade de estimular o tecido miocárdico, atua na pressão da contração e na frequência cardíaca. Além disso, aumenta o estado de alerta, atenção e reduz a fadiga, e como consequência melhora a memória, o aprendizado e a performance em exercícios. No entanto, deve ser considerado que o consumo em excesso leva a efeitos adversos (Lima, 2014 *apud* Arnaud, 2005; Farah, 2012).

A ingestão da Teobromina pode propiciar uma maior produção de urina pelos rins, ou seja, a substância apresenta um potencial efeito diurético, o que está relacionado com o aumento do fluxo sanguíneo chegando nos rins e o aumento da filtração glomerular (Lima, 2014 *apud* Rang *et al.*, 2001; Smith, 2002; Fisone *et al.*, 2004). Além disso, por estimular o metabolismo e poder contribuir positivamente para a redução do peso corporal, a teobromina vem sendo amplamente utilizada como termogênico (De Freitas Brito, 2023).

Já a Teofilina apresenta efeitos fisiológicos diretamente relacionados com a prevenção de sintomas crônicos da asma, sendo bastante utilizada não só no tratamento de quadros graves de asma, mas também de outras doenças respiratórias (Campos, 2015; Sanmartin Fernandez *et al.*, 2021).

3.3 SOLVENTES EUTÉTICOS

Os solventes são amplamente utilizados, desde a fabricação e descobertas de fármacos até a extração de composto bioativos e diversas outras aplicações. Dentre as citadas, os solventes orgânicos voláteis possuem um grande potencial de extração, mas trazem efeitos adversos, como toxicidade e alta volatilidade, podendo causar danos ao meio ambiente. Nesse contexto surgem os solventes eutéticos,

apresentando menor toxicidade, alta biodegradabilidade e um grande potencial extrativo (Ijardar *et al.*, 2022).

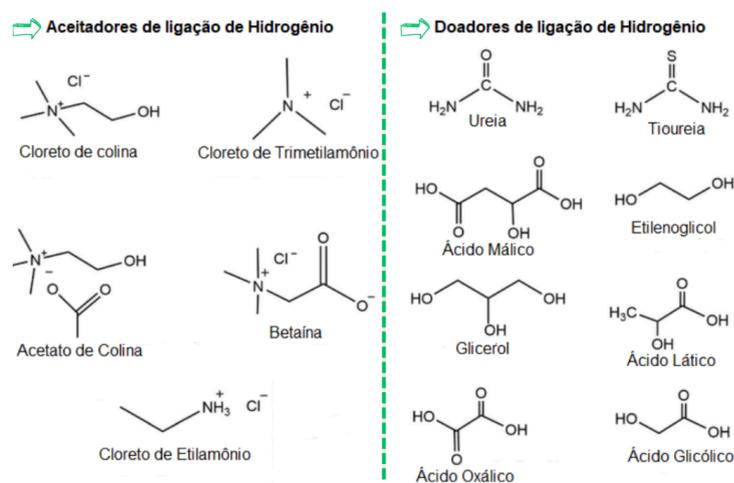
Os solventes eutéticos pertencem a uma classe de novos solventes verdes que apresentam propriedades inovadoras como, por exemplo, economia atômica, já que não produzem subprodutos durante suas sínteses eliminando a necessidade de uma etapa de purificação ou descarte de resíduos. Além disso, esses solventes possuem diversas aplicações, podendo ser utilizados como eletrólitos em baterias de lítio, na remoção de glicerol do biodiesel e como solventes de extração devido a sua capacidade de solvatação, que permite extrair compostos a partir de suas matrizes por meio de ligações de hidrogênio (Ferreira; Sarraguça, 2024).

Diferente da grande maioria dos solventes, esses são uma mistura de duas substâncias sólidas e/ou líquidas, sendo uma aceitadora de ligação de hidrogênio (HBA) e outra doadora de ligação de hidrogênio (HBD). O produto dessa mistura é líquida devido ao equilíbrio sólido-líquido entre os seus componentes, levando a um sistema eutético, ou seja, com uma redução do ponto de fusão. A depender do objetivo, por ser uma mistura, suas propriedades podem ser ajustadas a partir da proporção estequiométrica e da escolha de seus precursores.

A nomenclatura deep eutectic solvents (DES) cuja tradução corresponde a solventes eutéticos profundos é comumente utilizada. Sendo o termo profundo referente às acentuadas mudanças da temperatura de fusão do produto (DES) em relação aos seus precursores (Abranches, 2022 *apud* Martins *et al.*, 2019).

Um composto amplamente adotado como aceitador de hidrogênio na síntese de DES é o cloreto de colina, pois além de ser relativamente barato, não tóxico e biodegradável, pode facilmente formar uma mistura eutética com outra substância que atue como HBD, uma interação que ocorre pela formação de ligações de hidrogênio. Carboidratos, aminoácidos e ácidos carboxílicos são potenciais aceitadores de hidrogênio. Algumas das substâncias precursoras dos solventes verdes frequentemente presentes na literatura estão ilustradas na Figura 2 (Ijardar *et al.*, 2022; El Achkar, Greige-Gerges, Fourmentin, 2021).

Figura 2 - Alguns dos principais precursores de solventes eutéticos



Elaborado por Sampaio (2024)

3.4 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

A Extração assistida por ultrassom (EAU) é uma técnica que apresenta grande potencial na redução ou eliminação do uso de solventes tóxicos. Além de melhorar a eficiência do processo e o rendimento da extração, também aprimora a qualidade do extrato e não afeta a estabilidade dos compostos extraídos, já que a temperatura durante o processo é baixa.

A EAU é um procedimento rápido que consome pouca energia e utiliza uma quantidade menor de solvente, logo, produz menos resíduos, sendo uma técnica de extração limpa e favorável ao meio ambiente. Além disso, é de fácil uso, versátil e de baixo custo quando comparado a outras técnicas inovadoras como a extração de solvente pressurizado e a extração com fluidos subcríticos e supercríticos. Essa tecnologia verde e inovadora pode ser aplicada na extração de polissacarídeos, óleos essenciais, proteínas, peptídeos, corantes, pigmentos e compostos bioativos de interesse comercial (Tiwari, 2015).

Ao propagar o ultrassom em um meio é induzido uma série de compressões e rarefações nas moléculas presentes. Com a alternância das pressões ocorre a formação e o colapso de microbolhas, a denominada cavitação acústica. Outra consequência é a alta velocidade e agitação que permite colisões interparticulares. Essas mudanças no meio causam afinamento e ruptura de membranas celulares permitindo uma melhor penetração do solvente na matriz e proporcionando uma extração mais eficiente (Tiwari, 2015).

A EAU pode ser realizada em diferentes equipamentos, sendo o mais comum a utilização de banho e sonda ultrassônica. Por se propagar através do recipiente da amostra, o banho ultrassônico é considerado um método indireto. De maneira diferente, o método de sonda ultrassônica, envolve a introdução direta de um eletrodo no extrato, sendo assim mais eficiente que o banho no processo de extração (Santos Filho, 2021).

3.5 INFRAVERMELHO E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A maioria das substâncias orgânicas ou inorgânicas com ligações covalentes podem absorver diferentes frequências de radiação eletromagnética na região do infravermelho. O que corresponde a comprimentos de onda maiores que os associados a luz visível e menores do que os associados a micro-ondas, mais precisamente a denominada região vibracional do infravermelho. Se tratando de números de onda, essa faixa vai de 4000 a 400 cm^{-1} , o que corresponde a comprimentos de onda de $2,5$ a $25\text{ }\mu\text{m}$ (Pavia, 2010).

O instrumento onde é obtido os espectros (padrões de absorção) de cada composto denomina-se espectrofotômetro, equipado com uma fonte de radiação infravermelha, espelhos, divisor de feixe, detector e etc. Pode funcionar por transformada de Fourier (FT) ou instrumentos dispersivos. Em ambos os casos é possível obter espectros de substâncias em uma faixa entre 4000 e 400 cm^{-1} , os resultados são semelhantes, mas o infravermelho FT envolve um procedimento mais rápido e mais sensível que os instrumentos dispersivos. Em substâncias diferentes os espectros de infravermelho nunca serão idênticos, mesmo ocorrendo ligações em comum, os sinais irão se diferenciar devido ao ambiente único proporcionado em cada composto. Desse modo, esses padrões de absorção podem ser utilizados para a identificação de moléculas (Pavia, 2010).

Amostras sólidas para esse tipo de análise podem ser preparadas de diferentes maneiras, a mais utilizada é a mistura pulverizada e sob pressão da amostra junto a brometo de potássio que se funde incluindo o composto analisado na matriz, o resultado é uma pastilha de KBr. A principal vantagem do método é que o brometo de potássio é transparente até 400 cm^{-1} , dentre as desvantagens temos o custo do reagente e o fato de que ele absorve água, o que pode interferir no espectro. Outro método consiste em dissolver o composto analisado em um solvente, que por sua vez pode ser subtraído do espectro utilizando técnicas instrumentais. Amostras líquidas

em sua grande maioria, seguindo o método ATR não precisam de preparo (Pavia, 2010).

Já a cromatografia é um método físico-químico de separação fundamentada na diferença de interação do analito com a fase móvel e fase estacionária. Os componentes de uma mistura são retidos e distribuídos pela fase estacionária de acordo com sua seletividade, proporcionando assim a separação dos compostos presentes. Existe uma grande variedade de fases móveis e fases estacionárias, logo a cromatografia possui inúmeras aplicações (Amorim, 2019).

A Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE) é um tipo de cromatografia que envolve o emprego de uma coluna fechada com grande resistência à vazão da fase móvel, sendo assim necessário o uso de bombas de alta pressão (até 400 bars) que facilitam a migração da FM. Esse método apresenta a capacidade não só de separar, mas também, quantificar uma grande variedade de compostos presentes em diferentes tipos de amostras. Oferece grande sensibilidade, precisão, alta resolução e baixo tempo de análise (Amorim, 2019).

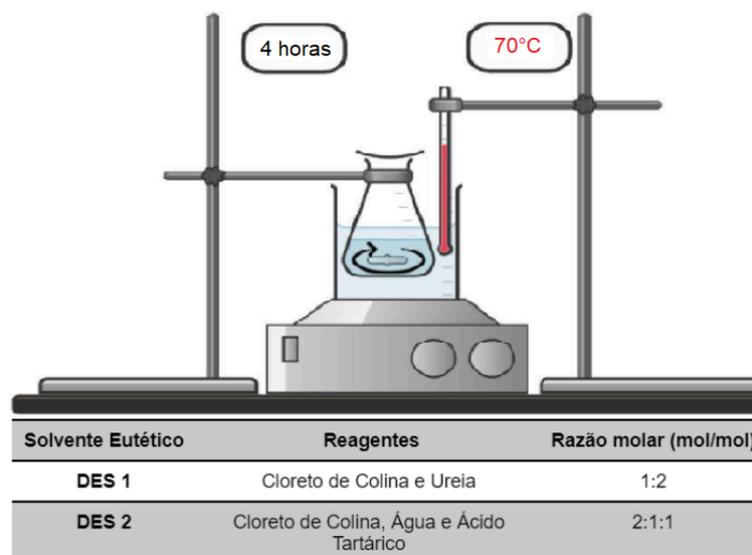
Dentre os componentes do instrumento temos: reservatórios das fases móveis, sistema de degaseificação, bomba, válvula de injeção, coluna, detector e um sistema de aquisição de dados. Os reservatórios da fase móvel onde a captação é feita a partir de um filtro capaz de reter partículas sem uma queda considerável da pressão. O sistema de bombeamento proporciona uma vazão constante através da coluna, aumentando assim a velocidade da análise sem interferir no sistema de detecção; a velocidade do fluxo ocorre entre 0,1 e 10 mL por minuto. O sistema de injeção permite que a amostra seja introduzida com auxílio de uma seringa e em seguida injetada na coluna; a válvula é resistente a pressões muito elevadas e fabricada de material inerte como teflon e aço inoxidável. A coluna utilizada raramente ultrapassa 30 cm, é reaproveitável, podendo portanto ser realizado centenas de separações com a mesma. Os detectores monitoram o efluente e fornecem a medida detectada do analito, seu funcionamento segue diferentes princípios e sua resposta é proporcional a alguma propriedade do analito; são exemplos de detectores o Espectrofotométrico (UV e Visível), Índice de Refração (RI), Espectrometria de Massas (MS) entre outros (Amorim, 2019).

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 PREPARO DOS SOLVENTES EUTÉTICOS

Os solventes eutéticos foram sintetizados pelo método de aquecimento com agitação descrito por Costa (2016). O processo de síntese envolveu o uso de uma placa de aquecimento com auxílio de uma barra magnética e um termômetro, a mistura foi homogeneizada em banho maria a temperatura de 70°C por 4h. Os solventes tiveram como aceitador de ligação de hidrogênio o Cloreto de Colina e como doadores de ligação de hidrogênio o Ácido Tartárico e a Ureia. A Figura 3 ilustra a aparelhagem e apresenta as razões molares dos reagentes.

Figura 3 - Síntese dos solventes eutéticos (DES)



Fonte: Sampaio (2024)

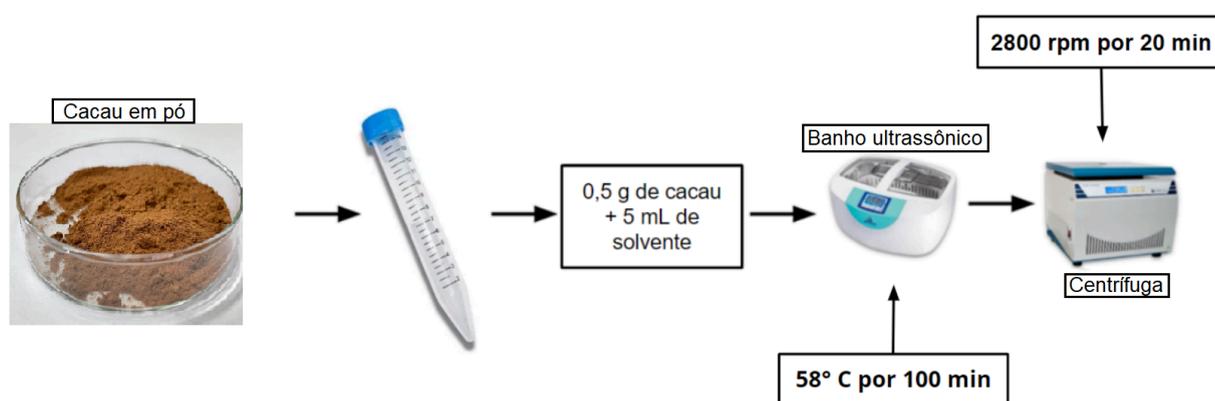
4.2 CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

Todos os solventes eutéticos foram caracterizados a partir da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). O equipamento utilizado para a obtenção dos espectros foi o IRAffinity-1S (Shimadzu). O procedimento envolveu a diluição dos precursores dos solventes eutéticos em acetonitrila. A partir da adaptação de uma metodologia, os espectros de cada DES e seus precursores foram registrados na faixa de 4000 - 400 cm^{-1} (Costa *et al.*, 2023).

4.3 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

Com o objetivo de avaliar a capacidade extrativa dos solventes, os extratos foram preparados conforme a Figura 4. O cacau em pó comercial foi adquirido em um mercado localizado no centro de Porto Seguro - Bahia - Brasil. Os extratos foram preparados em tubos de centrifuga tipo Falcon® de 15 mL com a adição de 0,5g de cacau em pó, 5 mL dos solventes DES 1, DES 2, EtOH e MeOH (20% água ultrapura Milli-Q). Após agitação manual para dispersão, as misturas foram submetidas a processo de extração por ultrassom a 58°C por 100 minutos. Logo após, foram centrifugadas a 2800 rpm por 20 minutos para a separação dos componentes sólidos dos solventes (Bakirtzi *et al.*, 2016).

Figura 4 - Preparo dos extratos



Fonte: Sampaio (2024)

4.4 ANÁLISE POR CLAE-DAD

Os extratos obtidos pelos diferentes solventes foram submetidos a processo de pré-tratamento para posterior análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O procedimento consistiu na diluição de 1 mL de cada extrato em 3 mL de metanol grau HPLC e 1 mL de água ultrapura. Em seguida, as amostras passaram por filtração em membranas GxP/PVDF de 0,2 µm. Por fim, com o auxílio de uma bomba peristáltica, as amostras foram conduzidas para cartucho de C18 Strata Phenomenex® e os eluentes coletados em tubos de centrifuga de 15 mL (Silva Souza, 2020).

Com objetivo de determinar a eficiência de extração de cada solvente foram realizadas análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodo (CLAE-DAD, Shimadzu), o sistema conta com uma unidade de

gaseificação DGU-20A, um detector de arranjo de diodos da série SPD-M20A e injeção manual. O controle do equipamento e a aquisição de dados, são gerenciados pelo software LC Solution da Shimadzu.

Se tratando de uma cromatografia utilizamos uma fase móvel e uma fase estacionária. De maneira mais específica, a cromatografia de alta eficiência utiliza como fase móvel um sistema isocrático (sem variação), ou um sistema de gradiente (com variação). A fase estacionária empregada foi uma coluna de C18, onde os padrões injetados ficaram retidos, ao passar pela coluna, a fase móvel retirou os compostos de interesse, separando-os de acordo com suas interações com o gradiente.

Para isso, foi necessário um estudo, feito a partir da injeção de padrões de cada composto (teobromina, cafeína e teofilina) e de um mix com as três substâncias juntas, determinando como fase móvel, um sistema de gradiente com ácido acético 1% e metanol (Tabela 2). As injeções foram efetuadas em triplicata em coluna analítica de fase reversa Shim-Pak C-18 (Tabela 3)(Silva Souza, 2020). A Figura 5 abaixo resume e ilustra esses procedimentos.

Tabela 2 - Fase móvel a ser empregada na análise por CLAE

| Tempo (min) | A | B |
|--------------|-----|-----|
| 0,02 - 2,00 | 80% | 20% |
| 2,01 - 10,00 | 70% | 30% |

A= ácido acético 1%; B= metanol

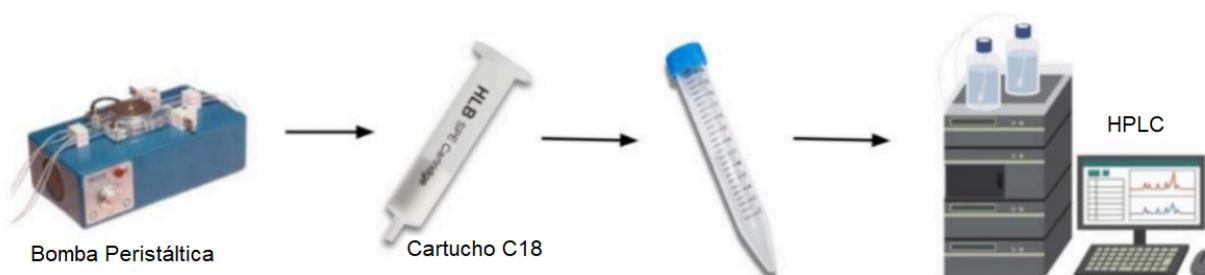
Elaborado por Sampaio (2024)

Tabela 3 - Especificações da coluna

| Coluna analítica de fase reversa Shim-Pak C-18 | |
|--|--------------------------|
| Dimensão | 150 x 4,6mm |
| Diâmetro de partícula | 5 µm |
| Taxa de fluxo | 1,0 mL min ⁻¹ |
| Volume de injeção | 20 µL |

Elaborado por Sampaio (2024)

Figura 5 - Quantificação dos extratos por CLAE-DAD



Elaborado por Sampaio (2024)

4.5 PARÂMETROS PARA A VALIDAÇÃO E TRATAMENTO DOS DADOS

A confecção da curva de calibração de cada metilxantina foi realizada utilizando o programa Microsoft Excel 2010. Os gráficos referentes ao espectro no infravermelho de cada solvente eutético e seus precursores, assim como os cromatogramas dos extratos, foram plotados por meio do programa Origin 2024.

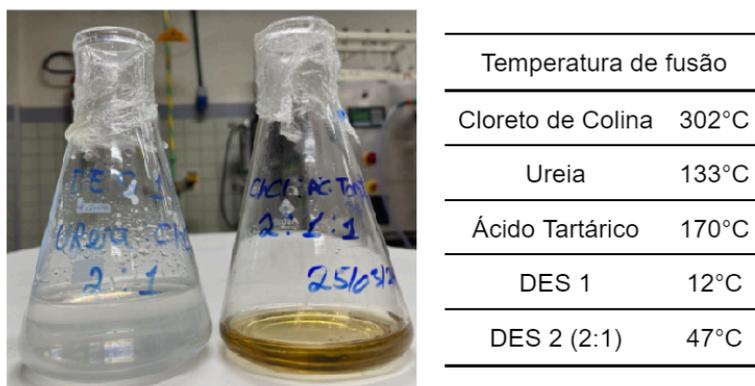
A validação foi realizada conforme os parâmetros estabelecidos na Resolução da Diretoria Colegiada N°166, de 24 de julho de 2017 da Anvisa. Ela inclui exatidão, precisão, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade e faixa de trabalho.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS SOLVENTES VERDES

A síntese dos solventes eutéticos realizada por meio de aquecimento sob agitação (Costa, 2016) foram bem sucedidas, visto que, apresentaram alterações significativas no ponto de fusão entre os solventes eutéticos e seus precursores. Vale ressaltar que a temperatura de fusão acima da temperatura ambiente do DES 2, encontrada na literatura, corresponde a proporção 2:1 (figura 6), sendo, respectivamente, cloreto de colina e ácido tartárico; já o sintetizado, possui proporção 2:1:1, com adição de água (Liu, 2015).

Figura 6 - Solventes eutéticos sintetizados e suas temperaturas de fusão



A caracterização por meio do FTIR (Figura 7) indica a formação dos solventes verdes. De modo geral, ao analisar e comparar os espectros de infravermelho dos precursores com o dos solventes eutéticos é possível evidenciar deslocamentos e alterações na intensidade de algumas bandas, indicando a síntese bem sucedida dos solventes verdes.

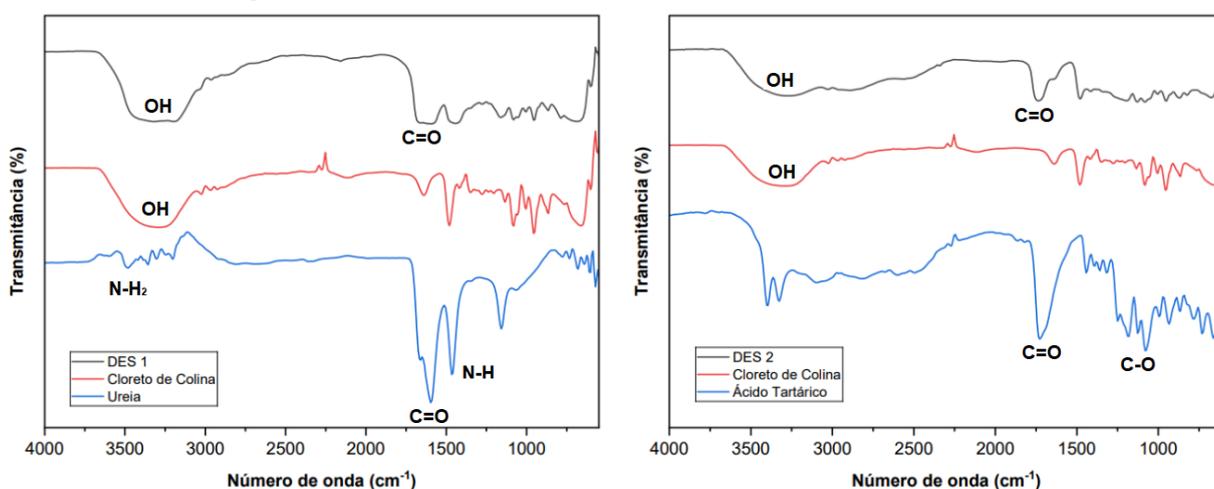
No DES 1 a interação entre o grupo hidroxila do cloreto de colina com o grupo carbonila da ureia favorece a formação de ligações de hidrogênio. O mesmo acontece no DES 2, entre o grupo hidroxila do cloreto de colina e os grupos carbonila do ácido tartárico. Sendo evidenciado nos espectros de infravermelho dos solventes verdes a partir de deslocamentos nos comprimentos de onda e mudanças nas intensidades da absorção.

Referente à formação de ambos os solventes eutéticos (linhas em preto), o grupo hidroxila (OH), na faixa entre 3600-3000 cm^{-1} , apresenta uma variação na intensidade das bandas, assim como o grupo carbonila (C=O), na faixa entre

1740-1660 cm^{-1} , o grande deslocamento e variação de intensidade notado evidencia que esses grupos funcionais são os principais envolvidos na formação de ambos os solventes.

Se tratando da formação do DES1 (espectro da esquerda, linha em preto), na região entre 3600-3400 cm^{-1} em relação à ureia (linha em azul), observa-se alterações associadas às vibrações das ligações N-H₂, indicando a participação desses grupos em sua formação (Costa *et al.*, 2023).

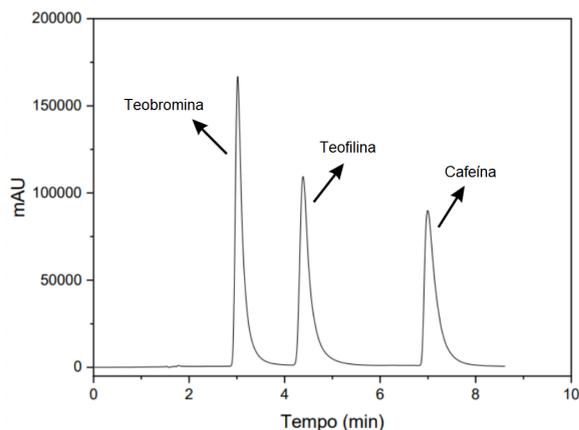
Figura 7 - Espectro no infravermelho dos DES e seus precursores



5.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

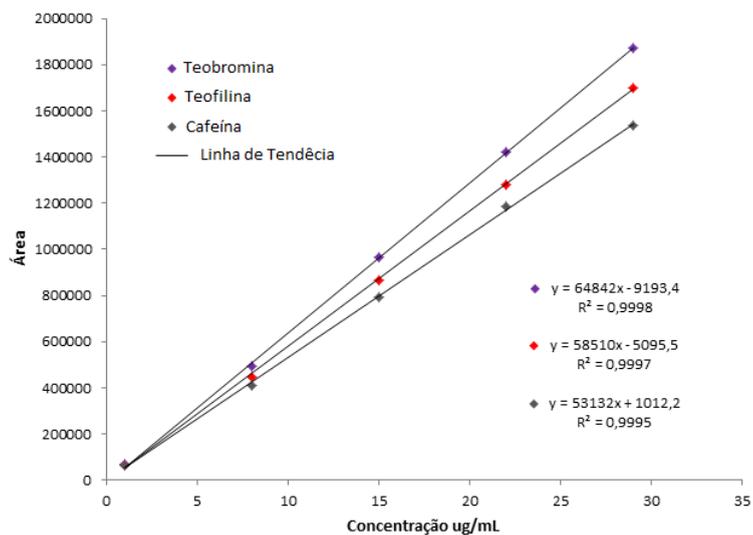
As condições cromatográficas desenvolvidas para a quantificação das metilxantinas extraídas pelos solventes foram iniciadas a partir da separação e do tempo de retenção dos padrões: teobromina (3,00 minutos), teofilina (4,30 minutos) e cafeína (7,00 minutos) (Figura 8).

Figura 8 - Cromatogramas dos padrões frente ao gradiente empregado; tempo de retenção: teobromina (3,00 minutos), teofilina (4,30 minutos) cafeína (7,00 minutos).

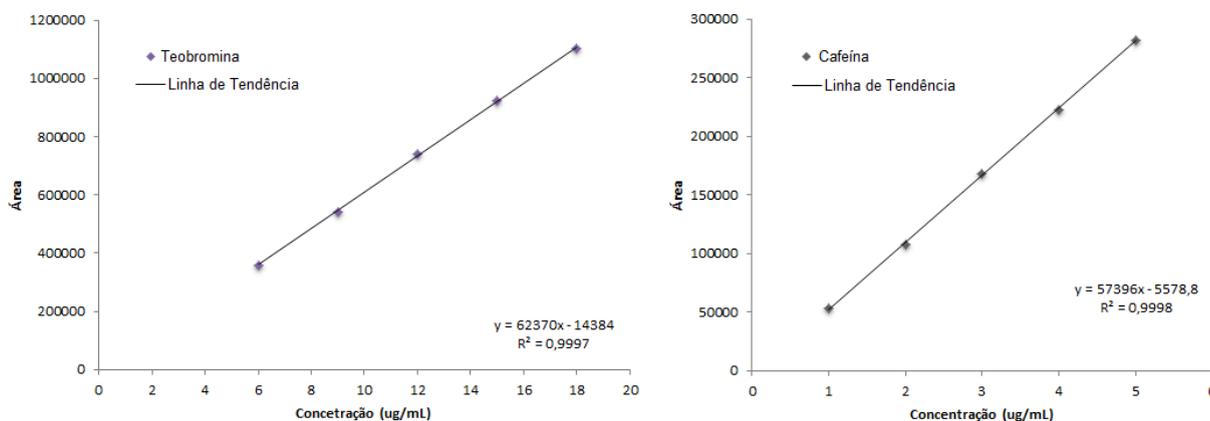


Após a definição do gradiente e a verificação do tempo de retenção de cada composto, com o intuito de estimar as concentrações extraídas pelos solventes e a faixa de trabalho, elaborou-se uma curva de calibração exploratória com concentrações entre 1 - 29 ug/mL (Figura 9).

Figura 9 - Estudo da linearidade: curva exploratória (1 - 29 ug/mL)



Em seguida, a partir da determinação da faixa de trabalho foram elaboradas as curvas de calibração (Figura 10), utilizadas como instrumento de quantificação dos compostos bioativos.

Figura 10 - Curvas de calibração (Teobromina: 6 - 18 ug/mL) e (Cafeína : 1 - 5 ug/mL)

A partir dos dados adquiridos por área e da medida da linearidade, foram calculados os limites de detecção e quantificação para cada padrão (Quadro 1). Os coeficientes lineares obtidos estão acima do valor mínimo 0,990 estipulado pela RDC N°166 (ANVISA, 2017).

Quadro 1 - Limite de detecção (LD), Limite de quantificação (LQ), Equação da Reta (ER), Regressão linear (R^2), Tempo de retenção (tR), Desvio padrão (DP), Desvio padrão relativo (DPR).

| Analito | LD ^a | LQ ^a | ER | R ² | tR ^b ± DP | DPR% |
|------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------|----------------------|------|
| Teobromina | $3,87 \times 10^{-9}$ | $1,29 \times 10^{-8}$ | $y = 62370x - 14384$ | 0,9997 | $3,01 \pm 0,03$ | 0,88 |
| Teofilina | $5,86 \times 10^{-9}$ | $1,95 \times 10^{-8}$ | $y = 58510x - 5095,5$ | 0,9997 | $6,97 \pm 0,09$ | 0,94 |
| Cafeína | $6,86 \times 10^{-9}$ | $2,28 \times 10^{-8}$ | $y = 57396x - 5578,8$ | 0,9998 | $4,45 \pm 0,04$ | 1,24 |

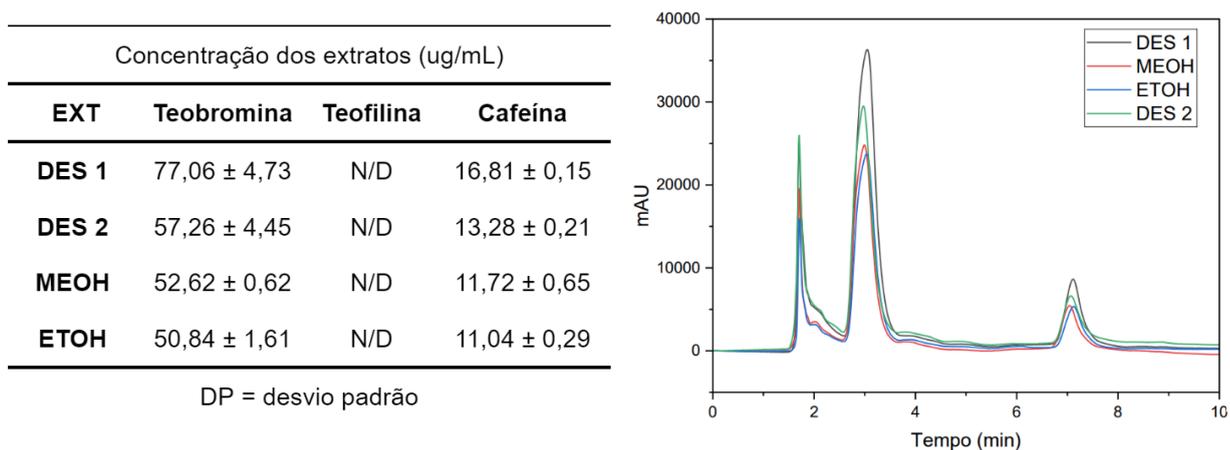
^a Os valores são expressos em $\mu\text{g/mL}$;

^b O tempo é expresso em minutos.

Ao analisar os extratos preparados com os solventes eutéticos DES 1 e DES 2, assim como os solventes convencionais metanol e etanol, observou-se que todos os solventes utilizados extraíram Teobromina e Cafeína (Figura 11). Além disso, observando os cromatogramas dos extratos (Figura 11), onde a linha em preto corresponde ao DES 1 e a linha em verde ao DES 2, evidencia-se que ambos os solventes eutéticos demonstraram uma capacidade extrativa de metilxantinas superior ao metanol e ao etanol (respectivamente, linhas em vermelho e em azul), sendo

destaque o DES 1 sintetizado a partir do cloreto de colina e ureia que atingiu uma melhor extração de ambos os compostos (Teobromina e Cafeína). Em contrapartida, os cromatogramas indicam que a Teofilina não foi detectada em nenhum dos solventes utilizados.

Figura 11 - Concentrações e leituras dos extratos por CLAE-DAD (mAU = intensidade)

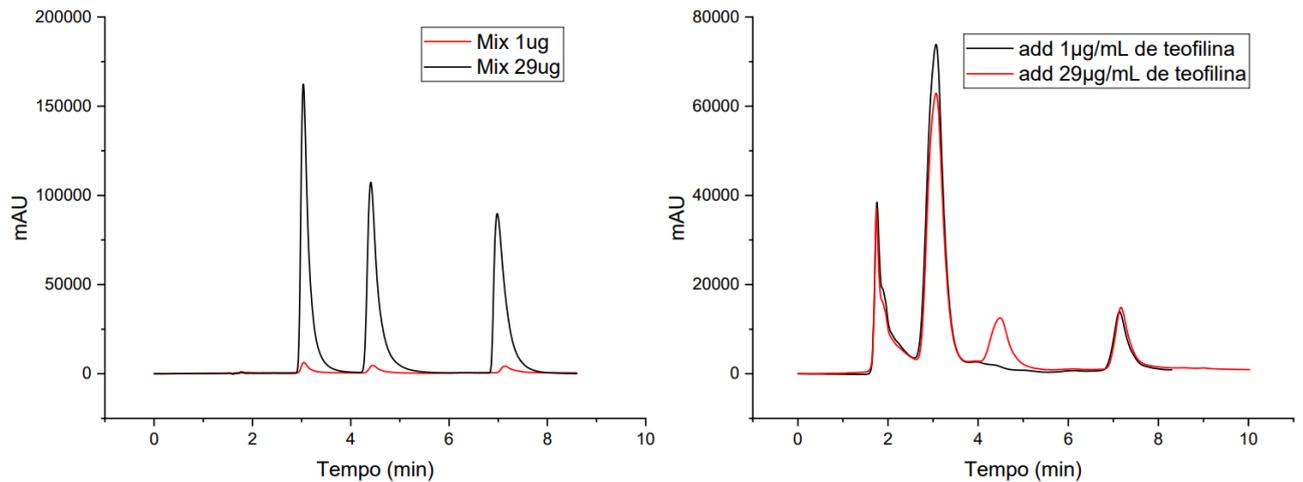


Fonte: Sampaio (2024)

Considerando o baixo LD, a não detecção da teofilina pode ser justificada pelo efeito matriz do cacau que é indicado na comparação entre o cromatograma dos padrões em mix de 1µg/mL e 29µg/mL, solubilizados em metanol; e os cromatogramas do extrato com adição de padrões de teofilina de 1µg/mL e 29µg/mL (Figura 12).

Ainda, observa-se que mesmo na concentração mais baixa, de 1µg/mL, a teofilina foi detectada no mix de padrões; o mesmo não acontece quando é adicionado ao extrato, onde esse composto só passa a ser detectável em concentrações mais elevadas. Além disso, ao comparar as intensidades, nota-se uma diferença considerável.

Figura 12 - Comparação entre o mix de padrões e a adição de metilxantinas nos extratos. (add = adição de).



Vale ressaltar que os cromatogramas com adição de padrões são referentes a uma tentativa de recuperação, onde foi adicionado não só teofilina, mas também teobromina e cafeína, um procedimento em triplicata, seguindo as concentrações de suas respectivas curvas.

Esse efeito pode ser ocasionado pela complexidade do cacau como matriz, que inclui não somente polifenóis e metilxantinas, mas também, compostos como pirazinas, aldeídos, éteres, tiazóis, fenóis, cetonas, álcoois, furanos e ésteres, formados a partir da degradação de aminoácidos livres e açúcares redutores durante a torração, e por sua vez, podem ou não atuar como interferentes (Melo, 2018). Outro ponto são as baixas concentrações de teofilina presentes no cacau e em seus derivados, podendo, às vezes, não ser detectada (Ferreira, 2013).

Entretanto, como o objetivo do trabalho não é quantificar as metilxantinas presentes no cacau, mas sim, comparar a capacidade extrativa dos solventes verdes frente aos convencionais, esse contratempo, não afetou a conclusão do mesmo.

Com sínteses sem etapas de purificação ou necessidade de descarte de resíduos, os solventes eutéticos se mostram como uma alternativa mais limpa e ambientalmente correta no processo de extração de metilxantinas. Apresentam uma boa capacidade de extração, baixa toxicidade, baixa volatilidade e além disso, devido suas composições químicas, podem apresentar elevada biodegradabilidade. Desse modo, atende aos ODS 9 e 12, podendo contribuir na redução do impacto ambiental.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação aos solventes eutéticos de Cloreto de Colina com Uréia e Cloreto de Colina com Ácido Tartárico, o ponto eutético foi atingido, visto que diante de precursores sólidos com elevadas temperaturas de fusão, ambos os solventes passaram a ser líquidos à temperatura ambiente, logo, as sínteses foram bem sucedidas, assim, como suas devidas caracterizações por infravermelho.

Se tratando da extração de metilxantinas presentes no cacau comercial, esse estudo constatou a notável capacidade extrativa dos solventes eutéticos frente aos convencionais etanol e metanol, confirmando a aplicabilidade deles nesse tipo de extração. Todos os solventes testados extraíram teobromina e cafeína. E após a comparação dos solventes, observou-se que ambos os eutéticos superaram o etanol e o metanol; com o destaque para o DES 1 que foi quem melhor extraiu a cafeína e a teobromina. Contudo, não foi possível detectar teofilina em nenhum dos extratos.

Ainda assim, os resultados classificam os solventes verdes, DES1 e DES2, como eficazes na extração de metilxantinas (teobromina e cafeína) em cacau comercial. Logo, além de uma alternativa mais limpa que prioriza a sustentabilidade e minimiza o impacto ambiental, esses solventes são eficientes.

REFERÊNCIAS

- ABRANCHES, D. O. *et al.* Using COSMO-RS to design choline chloride pharmaceutical eutectic solvents. **Fluid Phase Equilibria**, v. 497, p. 71-78, 2019.
- ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acesso em: julho de 2024.
- AMORIM, Antônia F. V. **Métodos Cromatográficos**. 1ª edição. EdUECE, 2019.
- ARAUJO, M. *et al.* A Mata Atlântica Sula da Bahia: Situação atual, ações e perspectivas. Séries Estado e Regiões da RBMA, **Reserva da Biosfera da Mata Atlântica**. São Paulo, MAB/UNESCO, 1998.
- BAKIRTZI, C.; TRIANTAFYLLIDOU, K.; MAKRIS, D. P. Novel lactic acid-based natural deep eutectic solvents: Efficiency in the ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from common native Greek medicinal plants. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3, n. 3, p. 120-127, 2016.
- BUBALO, M. C.; Čurko N.; Tomašević, M.; Ganić, K. K.; Redovniković, I.R. Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. **Food Chemistry**. 200, 1, 159-166, 2016.
- CAMPOS, H. S. Asma grave. **J Bras Med**, v. 103, n. 2, p. 13-21, 2015.
- COSTA, A. F. **Estudo das propriedades termofísicas dos solventes eutéticos e desenvolvimento de novas membranas sustentáveis para a separação de CO₂**. 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade Nova de Lisboa Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2016.
- COSTA, W. *et al.* **Obtenção, caracterização e aplicação de solventes eutéticos profundos na extração de compostos fenólicos presentes no resíduo do abacaxi (Ananas comosus)**. Tese (doutorado) - Universidade Federal da Paraíba, 2023.
- DA ROCHA, L. *et al.* Uso de plantas medicinais: Histórico e relevância. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e44101018282-e44101018282, 2021.
- DE FREITAS BRITO, L. *et al.* Uso da teobromina como auxiliar da termogênese: Um aliado na luta contra a obesidade. **Editora Licuri**, p. 30-39, 2023.
- EL ACHKAR, T.; GREIGE-GERGES, H.; FOURMENTIN, S. Basics and properties of deep eutectic solvents: a review. **Environmental chemistry letters**, v. 19, p. 3397-3408, 2021.
- FERREIRA, A. S. **Validação da determinação de teobromina em amostras de cacau e seus derivados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**. 2013. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2013.

FERREIRA, C.; SARRAGUÇA, M. A Comprehensive Review on Deep Eutectic Solvents and Its Use to Extract Bioactive Compounds of Pharmaceutical Interest. **Pharmaceuticals**, v. 17, n. 1, p. 124, 2024.

FILHO, V.C.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, 21, 1, 1998.

IJARDAR, S. P.; SINGH, V.; GARDAS, R. L. Revisiting the physicochemical properties and applications of deep eutectic solvents. **Molecules**, v. 27, n. 4, p. 1368, 2022.

JANKECH, T. *et al.* Determination of methylxanthines in tea samples by HPLC method. **Nova biotecnologica et chimica**, v. 18, n. 2, p. 124-132, 2019.

LIMA, J. P. **Contribuição de alimentos fonte para a ingestão dietética habitual estimada de metilxantinas no Brasil e no município do Rio de Janeiro**. 2014. Tese de Doutorado. Instituto de Nutrição, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

LIU, P. *et al.* Recent advances in the application of deep eutectic solvents as sustainable media as well as catalysts in organic reactions. **RSC advances**, v. 5, n. 60, p. 48675-48704, 2015.

LOMBA, L. *et al.* Applications of deep eutectic solvents related to health, synthesis, and extraction of natural based chemicals. **Applied Sciences**, v. 11, n. 21, p. 10156, 2021.

MELO, C. **Avaliação físico-química e identificação dos compostos voláteis em chocolates provenientes de diferentes variedades de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. Orientador: Sérgio Eduardo Soares. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2018. Disponível em: <https://pgalimentos.ufba.br/sites/pgalimentos.ufba.br/files/calionara_waleska_barbos_a_de_melo.pdf>. Acesso em: agosto de 2024.

ONU Brasil - **Os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável no Brasil**. Nações Unidas no Brasil, c2024. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br>. Acesso em 17 mar. 2024.

Parque das Aves, 07 de julho, 2022. **Conheça a cabruca, cultivo de cacau que protege a Mata Atlântica**. Disponível em: <<https://www.parquedasaves.com.br/blog/conheca-a-cabruca-cultivo-de-cacau-que-protege-a-mata-atlantica/>>. Acesso em: dezembro de 2023.

PAVIA, D. L. *et al.* **Introdução a Espectroscopia**. Tradução da 4ª edição norte-americana. Cengage Learning, 2010.

RUESGAS-RAMÓN, M.; FIGUEROA-ESPINOZA, M. C.; DURAND, E. Application of deep eutectic solvents (DES) for phenolic compounds extraction: Overview, challenges, and opportunities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 18, p. 3591-3601, 2017.

SANMARTIN-FERNANDEZ, M.; ZAMORANO, J. L. Teofilina para o alívio da dispneia relacionada ao ticagrelor. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 117, p. 146-148, 2021.

SANTIN, L. G. **Estudo dinâmico, eletrônico e cinético dos complexos curcumina-metanol e teobromina-água**. 2018. Tese de Doutorado. Instituto de Física da Universidade de Brasília, 2018.

SANTOS FILHO, A. F. *et al.* Extração assistida por ultrassom de compostos bioativos das matrizes vegetais (*Eryngium foetidum* L e *Talinum triangulare* Jacq. Willd) do bioma Amazônico utilizando solventes verdes. 2021.

SILVA SOUZA, L. **Estudo de espécies vegetais bioativas da mata atlântica do sul da Bahia**. 2020. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Sul da Bahia, Porto Seguro. 68 p. 2020.

SOUSA-AGUIAR, E. F. *et al.* Química verde: a evolução de um conceito. **Química Nova**, v. 37, p. 1257-1261, 2014.

TIWARI, B. K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 100-109, 2015.