

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MÉTODOS
ANALÍTICOS VERDES PARA A EXTRAÇÃO DE
FLAVONOIDES A PARTIR DE RESÍDUOS DE *PASSIFLORA*
EDULIS SIMS F. FLAVICARPA DEG.”**

Ana Paula Lopes*

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de MESTRE EM QUÍMICA, área de
concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.**

Orientadora: Profa. Dra. Dra. Vânia Gomes Zuin

*** Bolsista (CAPES)**

São Carlos - SP
2018



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Ana Paula Lopes, realizada em 27/09/2018:

Profa. Dra. Vânia Gomes Zuin
UFSCar

Prof. Dr. Cintia Alessandra Matiucci Pereira
UNICEP

Prof. Dr. Felipe Christoff Wouters
UFSCar

DEDICATÓRIA

A Deus,

Por ter me dado inteligência e sabedoria durante esta jornada. Agradeço por me guiar sempre pelo caminho certo.

À minha mãe Filomena e a meu pai José Luiz,

Pelo apoio e incentivo na vida, que não mediram esforços para eu sempre estudar.

Ao meu marido,

Por todo o apoio desde o início do mestrado.

À família Uzeda,

Meus sogros, Maurício e Analice e meus cunhados Vinícius, Talita, Henrique e Alice, pelas orações e por entenderem a minha ausência no cotidiano,

Aos demais membros da família,

Meus tios(as) e primos(as) pelas orações e por entenderem a minha ausência durante a minha dedicação a este trabalho.

Aos meus amigos próximos,

Que compartilharam comigo os momentos de dúvidas, medo, aflições e alegrias.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Vânia Zuin, pela paciência e ensinamentos e, também à banca avaliadora do seminário de qualificação, ao Prof. Dr. Moacir Forim e à Profa. Dra. Cíntia Matiucci;

À banca avaliadora da defesa do mestrado pelo aceite ao convite, aos membros oficiais Prof. Dr. Felipe (UFSCar) e à Profa. Dra. Cintia Matiucci (UNICEP); e como membros suplentes, à Profa. Dra. Aline Oliveira (UFSCar) e à Profa. Dra. Maria Olímpia Rezende (USP), ao Prof. Dr. Antônio Aprígio da Silva Curvelo (USP) e ao Dr. Eli Fernando Pimenta (UFSCar);

Aos membros do Grupo de Pesquisa em Química Verde, pelas discussões calorosas sobre esse trabalho;

A todos os alunos, técnicos e professores do laboratório de Produtos Naturais que de alguma forma colaboraram com esse trabalho; especialmente ao Luiz, João e Marília;

Aos professores e alunos laboratório GAIA (DQ - UFSCar), especialmente ao Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nobrega e à técnica Dra. Lucimar Lopes Fialho, por todo o auxílio no manuseio do equipamento microondas, e ao Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho pelos ensinamentos de quimiometria;

Aos meus amigos pelo apoio, especialmente Bia, Léo, Dayane, Jomarc, Doraí, Airton;

À CAPES, pela bolsa de estudos.

LISTA DE ABREVIATURAS

UPLC: *Ultra Performance Liquid Chromatography*

PDA: *Photodiode Array*

QV: Química Verde

UV-B: Ultravioleta

QAV: Química Analítica Verde

EV: Estrela Verde

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

ICH: *International Conference on Harmonization*

LD: Limite de Detecção

LQ: Limite de Quantificação

IPE: Índice de Preenchimento da Estrela

ACN: Acetonitrila

λ : Comprimento de onda

DPR: Desvio Padrão Relativo

UV-Vis: Ultravioleta Visível

PTFE: Politetrafluoretileno

EtOH: Etanol

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 – Variáveis estudadas para o desenvolvimento do método de extração de flavonoides em resíduos de maracujá azedo por meio de ultra-turrax.....	17
TABELA 3.2 – Planejamento fatorial para a extração por meio do ultra-turrax.....	17
TABELA 3.3 – Variáveis estudadas para o desenvolvimento do método de extração de flavonoides em resíduos de maracujá azedo por meio do ultrassom.....	18
TABELA 3.4 – Planejamento fatorial para a extração por meio do ultrassom.....	18
TABELA 3.5 – Variáveis estudadas para o desenvolvimento do método de extração de flavonoides em resíduos de maracujá azedo por meio do microondas.....	19
TABELA 3.6 – Planejamento fatorial para a extração por meio do microondas.....	20
TABELA 3.7 – Pontuação para os riscos físico, saúde e ambiente de acordo com o perigo de cada reagente.....	21
TABELA 3.8 – Pontuação para degradabilidade e renovabilidade de cada composto.....	22
TABELA 3.9 – Tabela principal para a pontuação da métrica EV.....	23
TABELA 4.1 – Método cromatográfico de UPLC - PDA desenvolvido para as análises das extrações.....	27
TABELA 4.2 – Quantidade de compostos extraídos do ultra-turrax ($\text{mg.g}^{-1} \pm \text{DP}$).....	30
TABELA 4.3 – Influência das variáveis: 1, razão amostra/solvente 2; proporção de etanol; e 3 tempo no ultra-turrax.....	31
TABELA 4.4 – Melhores condições para a extração do ultra-turrax ($\text{mg.g} \pm \text{DP}$).....	33
TABELA 4.5 – Quantidade de compostos extraídos do ultrassom ($\text{.mg.g}^{-1} \pm \text{DP}$).....	36
TABELA 4.6 – Influência das variáveis: 1, razão amostra/solvente 2; proporção de etanol; e 3 tempo no ultrassom.....	37
TABELA 4.7 – Melhores condições para a extração do ultrassom ($\text{mg.g} \pm \text{DP}$).....	40
TABELA 4.8 – Quantidade de compostos extraídos do microondas ($\text{.mg.g}^{-1} \pm \text{DP}$).....	44
TABELA 4.9 – Influência das variáveis: 1, razão amostra/solvente; 2, proporção de etanol, 3, tempo e 4, temperatura, no microondas.....	45

TABELA 4.10 – Melhores condições para a extração do microondas (mg.g ± DP).....	46
TABELA 4.11 – Eficiência de extração dos flavonoides isoorientina, isovitexina e orientina dos melhores experimentos dos métodos estudados.....	49
TABELA 4.12 – Cálculo do gasto energético dos métodos de extração estudados.....	50
TABELA 4.13 – Pontuação da EV para os métodos de extração ultra-turrax, ultrassom e microondas.....	52
TABELA 4.14 – Método cromatográfico de UPLC - PDA otimizado para a validação do experimento 8 ultra-turrax.....	57
TABELA 4.15 – Parâmetros da curva de calibração no solvente.....	61
TABELA 4.16 – Resultados dos ensaios de recuperação e precisão para o extrato fortificado experimento 8 (ultra-turrax).....	62
TABELA 4.17 – Resultados do Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	63

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Principais Estados brasileiros produtores de maracujá em 2016.....	3
FIGURA 1.2 – Maracujá azedo ou amarelo (<i>Passiflora edulis</i>).....	3
FIGURA 1.3 – Maracujá doce (<i>Passiflora alata</i>).....	4
FIGURA 1.4 – Estrutura geral dos flavonoides.....	5
FIGURA 1.5 – Estrutura dos flavonoides estudados.....	6
FIGURA 1.6 – Métrica Estrela Verde.....	11
FIGURA 4.1 – Cromatograma obtido por UPLC-PDA em $\lambda=330$ nm dos padrões dos flavonoides estudados.....	27
FIGURA 4.2 – Curvas analíticas no solvente dos flavonoides orientina, isoorientina, isovitexina.....	28
FIGURA 4.3 – Porcentagem da influência das variáveis para o ultra-turrax.....	31
FIGURA 4.4 – Efeito positivo e negativo das variáveis para o ultra-turrax.....	32
FIGURA 4.5 – Perfil cromatográfico do ultra-turrax (experimento 8) da casca de maracujá azedo em $\lambda=330$ nm.....	34
FIGURA 4.6 – Espectros de absorção no UV-Vis em $\lambda=330$ nm do experimento 8 ultra-turrax dos analitos orientina (A), isoorientina (B) e isovitexina (C) nos tempos de retenção correspondentes.....	35
FIGURA 4.7 – Porcentagem da influência das variáveis para o ultrassom.....	38
FIGURA 4.8 – Efeito positivo e negativo das variáveis para o ultrassom.....	39
FIGURA 4.9 – Perfil cromatográfico do ultrassom (experimento 1) da casca maracujá azedo em $\lambda=330$ nm.....	41
FIGURA 4.10 – Espectros de absorção no UV em $\lambda=330$ nm do experimento 1 ultrassom dos analitos orientina (A), isoorientina (B) e isovitexina (C), nos tempos de retenção correspondentes	43
FIGURA 4.11 – Porcentagem da influência das variáveis para o microondas.....	45
FIGURA 4.12 – Efeito positivo e negativo das variáveis para o microondas.....	46
FIGURA 4.13 – Perfil cromatográfico do microondas (experimento 10) da casca do maracujá azedo. em $\lambda=330$ nm.....	48
FIGURA 4.14 – Espectros de absorção no UV em $\lambda=330$ nm do experimento 10 do microondas dos analitos orientina (A), isoorientina (B) e isovitexina (C) nos tempos de retenção correspondentes.....	49
FIGURA 4.15 – EV dos métodos de extração ultra-turrax, ultrassom e microondas.....	55
FIGURA 4.16 – Perfil cromatográfico dos padrões dos flavonoides estudados no método otimizado para a validação do método analítico em $\lambda=350$ nm.....	57

FIGURA 4.17 – Perfil cromatográfico do experimento 8 ultra-turrax no método otimizado para a validação analítica do método de extração em $\lambda=350$ nm.....	58
FIGURA 4.18 – Sobreposição do espectro de UV-Vis para avaliar a pureza dos analitos orientina, isorientina e isovitexina.....	59
FIGURA 4.19 – Curvas analíticas no solvente e no extrato (exp.8) dos analitos orientina, isorientina e isovitexina.....	61

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS VERDES PARA A EXTRAÇÃO DE FLAVONOIDES A PARTIR DE RESÍDUOS DE *PASSIFLORA EDULIS SIMS F. FLAVICARPA* DEG - Os conceitos trabalhados nesta dissertação debruçaram-se sobre os pressupostos da biorrefinaria, na qual os resíduos como cascas de alimentos podem ser valorizados. Nesse sentido, esta pesquisa teve como objetivo principal desenvolver, validar e aplicar métodos verdes para a extração de flavonoides a partir da casca do maracujá azedo ou amarelo da espécie *Passiflora edulis Sims f. flavicarpa* Deg, a qual é tomada, aqui, como matriz de estudo devido à sua atividade antioxidante, entre outros efeitos farmacológicos. Os três métodos analíticos estudados compreenderam a extração com solvente utilizando ultra-turrax, ultrassom e microondas, a partir dos quais puderam ser extraídos três flavonoides: orientina, isoorientina e isovitexina, que foram determinados por UPLC-PDA. O caráter verde de cada método foi analisado por meio da métrica Estrela Verde que, associado aos critérios analíticos, possibilitaram encontrar o melhor procedimento para a remoção dos flavonoides de interesse nas amostras. Cabe destacar que UPLC, a aplicação de quimiometria, estão associadas à escolha de solventes e demais materiais idealmente inócuos e renováveis, também pôde contribuir para aumentar o caráter verde de todo o estudo. Ao final deste trabalho, observou-se que, dentre os métodos de extração avaliados, o experimento de maior eficiência e caráter verde foi baseado em ultra-turrax (exp.8), que possibilitou extrair os flavonoides destacados em maior quantidade nos resíduos de maracujá-azedo.

PALAVRAS-CHAVE: Biorrefinaria; Maracujá; Métodos Analíticos Verdes de Extração; Ultra-turrax; Ultrassom; Microondas; Química Verde; UPLC.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND DEPLOYMENT OF GREEN ANALYTICAL METHODS FOR THE EXTRACTION OF FLAVONOIDS FROM PASSIFLORA EDULIS SIMS F. FLAVICARPA DEG. RESIDUES - The concepts developed in this dissertation were guided by biorefinery assumptions, in which residues such as food peels can be enriched. In this sense, this research had as its main objective to develop, validate and apply green methods for the extraction of flavonoids from the peel of *Passiflora edulis* Sims (yellow passion fruit), which is here taken as study matrix due to its antioxidant activity, among other pharmacological effects. The three studied analytical methods comprised the extraction with solvent using ultra-turrax, ultrasound and microwave equipment, from which three flavonoids could be extracted: orientin, isorientin and isovitexin, which were determined by UPLC-PDA. The green character of each method was analysed by means of the Green Star metric which, allied to analytical criteria, made it possible to find the best procedure for removing the flavonoids of interest in the samples. It is important to emphasize that UPLC and the application of chemometrics are associated to the choice of solvents and other ideally innocuous and renewable materials could also contribute to increase the green character of the whole study. At the end of this work, it was observed that, among the evaluated extraction methods, the most efficient and green-characterized experiment was based on ultra-turrax (exp.8), which made it possible to extract the selected flavonoids in greater quantity from the residues of sour passion fruit.

KEYWORDS: Biorefinery; Passion Fruit; Green Analytical Methods of Extraction; Ultra-Turrax; Ultrasound and Microwave; Green Chemistry; UPLC.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Biorrefinaria	1
1.2.	Maracujá	2
1.3.	Flavonoides	4
1.4.	Química Analítica Verde	6
1.5.	Métodos de extração de produtos naturais a partir de amostras vegetais	8
1.5.1.	Método de extração sólido-líquido com homogeneização por ultra-turrax	8
1.5.2.	Método de extração sólido-líquido assistida por ultrassom	9
1.5.3.	Método de extração sólido-líquido por microondas	9
1.5.4.	Quimiometria	10
1.5.5.	Métrica Estrela Verde	10
1.6.	Técnica de análise	11
1.6.1.	Ultra Performance Liquid Chromatography – UPLC	11
1.6.2.	Validação do método analítico	13
2.	OBJETIVOS	14
2.1.	Objetivos gerais	14
2.2.	Objetivos específicos	14
3.	PARTE EXPERIMENTAL	15
3.1.	Equipamentos e materiais	15
3.2.	Padrões analíticos, reagentes e solventes	15
3.3.	Preparo das amostras de <i>Passiflora edulis</i> Sims	16
3.4.	Desenvolvimento do método cromatográfico UPLC-PDA	16
3.5.	Curva analítica	16
3.6.	Método de extração por ultra-turrax	16
3.6.1.	Planejamento fatorial ultra-turrax	17
3.7.	Método de extração por ultrassom	18
3.7.1.	Planejamento fatorial ultrassom	18
3.8.	Método de extração por microondas	19
3.8.1.	Planejamento fatorial microondas	19
3.9.	Eficiência de extração e o gasto energético	20
3.10.	Construção da Estrela Verde	20
3.11.	Validação do método analítico	24
3.11.1.	Especificidade	24
3.11.2.	Linearidade	25
3.11.3.	Recuperação	25

3.11.4.	Precisão.....	25
3.11.5.	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	25
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1.	Desenvolvimento do método cromatográfico.....	26
4.2.	Curva analítica	27
4.3.	Escolha das variáveis para os métodos de extração.....	28
4.4.	Extração por ultra-turrax.....	29
4.4.1.	Planejamento fatorial ultra-turrax	29
4.4.2.	Influência das variáveis	30
4.4.3.	Perfil cromatográfico do extrato de maracujá azedo obtido por ultra-turrax	33
4.5.	Extração por ultrassom	36
4.5.1.	Planejamento fatorial ultrassom	36
4.5.2.	Influência das variáveis	37
4.5.3.	Perfil cromatográfico do extrato de maracujá azedo obtido por ultrassom.....	41
4.6.	Extração por microondas	43
4.6.1.	Planejamento fatorial microondas	43
4.6.2.	Influência das variáveis	44
4.6.3.	Perfil cromatográfico do extrato de maracujá azedo obtido por microondas	47
4.7.	Cálculo da eficiência de extração e do gasto energético	49
4.8.	Avaliação do grau verde dos métodos de extração pela métrica da Estrela Verde	50
4.9.	Validação do método analítico	56
4.9.1.	Otimização do método cromatográfico	56
4.9.2.	Especificidade	58
4.9.3.	Linearidade.....	59
4.9.4.	Recuperação e Precisão.....	62
4.9.5.	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	63
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVA FUTURA	64
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1 INTRODUÇÃO

Para fundamentação dos conceitos utilizados, neste tópico realizou-se uma sistematização da literatura. Iniciou-se com o conceito de biorrefinaria, na qual os resíduos como cascas de alimentos podem ser ressignificados e, além disso, aplicou-se este conceito na matriz de estudo, aqui tomado como a casca do maracujá. Os flavonoides são encontrados em diversas bebidas, frutos, verduras e hortaliças, e devido a sua biodiversidade e atividade antioxidante, estudou-se os métodos analíticos verdes baseados em ultra-turrax, ultrassom e microondas para extrair os flavonoides orientina, isoorientina e isovitexina da casca do maracujá. Sendo assim, os conceitos de química analítica verde como, por exemplo, a substituição do solvente fizeram-se necessários para desenhar procedimentos de extração verdes eficientes, robustos, precisos e rápidos, também aparados pelo uso de quimiometria. Para se avaliar o grau verde das extrações utilizou-se a métrica Estrela Verde. Por fim, apresentou-se a técnica de análise a determinação cromatográfica dos flavonoides, a UPLC-PDA (*Ultra Performance Liquid Chromatography detector Photodiode Array*), bem como as etapas da validação do método analítico para quantificar os compostos estudados.

1.1. Biorrefinaria

O Brasil é conhecido mundialmente pela sua economia agrária, com expressivas produções de soja e cana-de-açúcar e também com a geração de frutas e hortaliças, como maracujá e laranja (BRASIL, 2016). Parte desta produção é direcionada para uso doméstico e a outra parte é encaminhada à indústria, por exemplo, para a fabricação de sucos, doces e óleo essencial. Nas cadeias de produção até a obtenção do produto final há perdas consideráveis de biomassa, com destaque para as cascas e sementes dos frutos. Um exemplo é a produção de suco de maracujá, que utiliza aproximadamente 30% (da polpa) do fruto, sendo os demais 70% (cascas e sementes) descartados, tornando-se um resíduo agroindustrial muitas vezes problemático, impactando o ambiente (COELHO et al., 2011).

Diante deste cenário, o Brasil tornou-se um país com grande potencial para se aplicar o conceito da biorrefinaria e Química Verde (QV), na qual os resíduos serão ressignificados, sendo consideradas matérias-primas ou biomassas que podem possuir alto valor agregado, isto é, fontes alternativas de uma série de compostos e produtos derivados de petróleo (JUNIOR, 2011). No caso do resíduo de cascas e sementes do maracujá, podem-se extrair compostos bioativos (flavonoides) e produzir óleo essencial, respectivamente

(ZERAIK, 2010). Como salientado por ZUIN e RAMIN (2018), diversas biomassas que foram estudadas no âmbito da QV nos últimos 10 anos evidenciam que é possível aplicar esses conceitos na prática, objetivando escaloná-las.

1.2. Maracujá

Segundo FALEIRO (2016) e GOMES et al. (2017), o gênero *Passiflora* é popularmente conhecida como maracujá, do tupi-guarani *maraiú-ya*, que significa “fruto ou polpa que se toma aos poucos (de sorvo)”. Um dos primeiros relatos do maracujá data de 1587, na obra “Tratado descritivo do Brasil”, do autor português Gabriel Soares de Souza, definindo-a como uma planta com diversas funcionalidades (alimentar, medicinal e decorativa). Posteriormente, no século XVII, o historiador italiano Giacomo Bosio associou a estrutura da flor do maracujá com a crucificação de Jesus Cristo, dando origem ao nome do gênero *Passiflora*, do latim *passio* (paixão) e *floris* (flor).

Atualmente, o gênero *Passiflora* possui mais de 500 espécies dentro da família Passifloraceae, distribuídas principalmente na América Latina, com destaque no Brasil e na Colômbia. Dessas, apenas 83 espécies são encontradas no Brasil, sendo a *Passiflora edulis Sims f. flavicarpa* Deg (maracujá azedo ou amarelo) e *Passiflora alata* (maracujá doce) as espécies de maior interesse econômico (BERNACCI, et al., 2008; GOMES et al., 2017; ZERAIK, 2010).

MELLETTI (2011) e ZERAIK (2010) e realizaram uma discussão sobre o desenvolvimento do maracujá no Brasil, relatando que desde a década de 1970, o maracujá era comercializado apenas no mercado de frutas frescas, ou seja, não era processado. Na década de 1980, a produção de café passava por uma forte crise e a produção do maracujá surgiu como alternativa para os pequenos cafeicultores. O maracujazeiro adaptou-se no solo e no clima favorável da época e, além disso, os custos de produção eram baixos. Com 3 a 5 hectares era possível obter uma boa produção, atendendo as indústrias de fabricação de sucos. Na década de 1990, a fruta fresca foi valorizada devido ao aumento do consumo no mercado interno e, nos dias de hoje o Brasil é o maior consumidor de maracujá do mundo. Em 2016, o Brasil colheu aproximadamente 700 mil toneladas da fruta, em uma área total de 50 mil hectares. A Figura 1.1 mostra os principais estados brasileiros que contribuíram para que se alcançassem esses números.

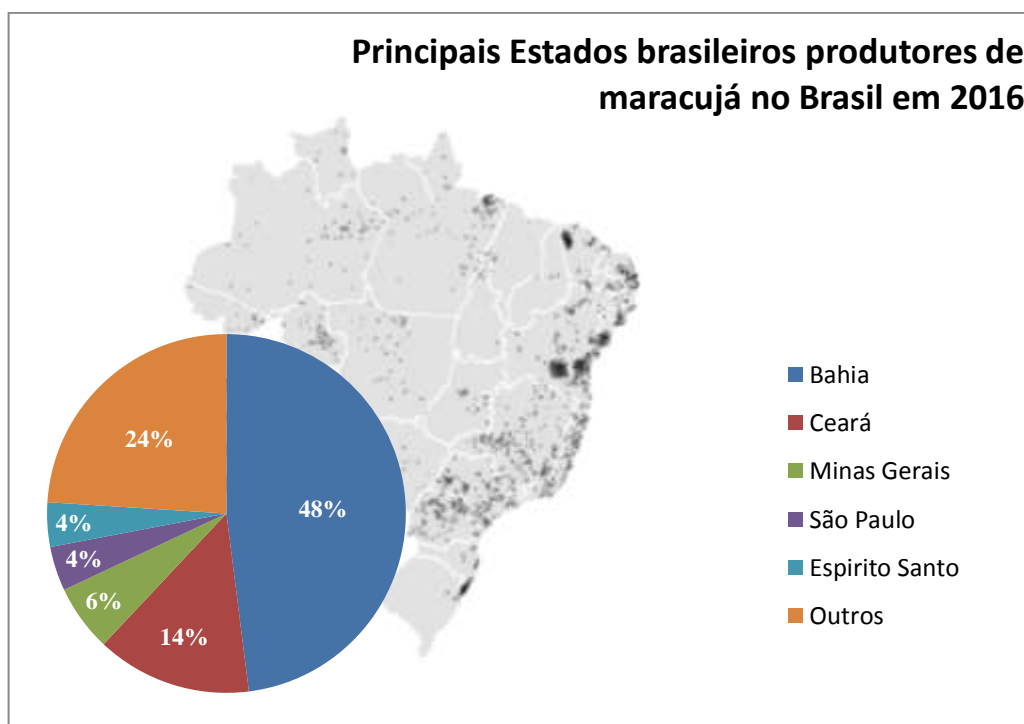


FIGURA 1.1 – Principais Estados brasileiros produtores de maracujá em 2016.
Fonte: BRASIL (2016) e NEXO (2018).

Diante de toda a produção brasileira, FREIRE et al. (2018) destacam que 95% referem-se ao maracujá azedo ou amarelo que é a espécie mais conhecida e consumida pela população. Além disso, é matéria-prima para as indústrias de sucos e do setor alimentício, e ainda, as flores do maracujá, que são consideradas exóticas, podem ser utilizadas na decoração ornamental. A Figura 1.2 ilustra a flor e o fruto do maracujá azedo ou amarelo.



FIGURA 1.2 – Maracujá-azedo ou amarelo (*Passiflora edulis*).
Fonte: GIACON (2016).

O maracujá-doce (*Passiflora alata*) é pouco conhecido pela população, embora seja responsável por 5% de toda a produção nacional. Seu consumo dá-se na forma fresca, graças ao baixo teor de acidez da sua polpa, e também a Farmacopeia Brasileira recomenda essa espécie para o uso de medicamentos fitoterápicos (Figura 1.3).



FIGURA 1.3 – Maracujá doce (*Passiflora alata*).
Fonte: GIACON (2017).

Além de medicamentos fitoterápicos, outras partes do maracujá apresentam potenciais tratamentos como, por exemplo, os estudos de OTIFY et al. (2015) e ZUCOLOTTI et al. (2009) destacaram o uso de folhas para tratamento de ansiedade e ação anti-inflamatória, respectivamente. Além disso, ZERAIK et al. (2010) destacam que as folhas e a polpa do maracujá são ricas em vitaminas.

Além disso, as cascas e sementes tornaram-se um resíduo agroindustrial, mas aplicando-se o conceito de biorrefinaria os resíduos são considerados matérias primas, caracterizando-se como fonte de flavonoides, dentre outras substâncias, que foram anteriormente estudadas, por exemplo, por MALACRIDA E JORGE (2012) e ZERAIK et al. (2012).

1.3. Flavonoides

Como discutido por LOPES et al. (2000) e RESENDE (2011) e os flavonoides são compostos fenólicos de origem vegetal, cuja síntese não ocorre no organismo humano. O termo “flavonoide” origina-se do latim *flavus* que significa amarelo, mas engloba uma grande diversidade de compostos com variações de cores vibrantes como, alaranjado, violeta, azul, vermelho, presente nos frutos e flores. Sua função é atrair os polinizadores e nas folhas esses compostos são essenciais para proteger a planta contra fungos e radiação ultravioleta (UV-B).

Além disso, os flavonoides também estão presentes em bebidas (vinho, chás, sucos de laranja e maçã), frutas (morango, manga, framboesa, amora e maracujá), verduras e hortaliças (brócolis, couve, cebola, cenoura), entre outros como destacado por BEHLING et al. (2004) e GOULART et al. (2009). Apesar de não apresentar valor nutritivo, estudos têm demonstrado que os flavonoides possuem atividade biológica atuando como antioxidante, anti-inflamatório, antialérgico e vasodilatador, representando grande potencial de pesquisa (COUTINHO et al., 2009; LOPES et al., 2000; MACHADO et al., 2008).

Os flavonoides são os maiores grupos de metabólitos secundários das plantas, estão presentes na fotossíntese celular, e também possuem baixo peso molecular. Além disso, a estrutura molecular do flavonoide, segundo RESENDE (2011), é representada por um núcleo característico da benzo- γ -pirona, que consiste num esqueleto difenil propano (C6C3C6) com dois anéis benzênicos (A e B) ligados a um anel pirano (C). Essa descrição pode ser observada na Figura 1.4.

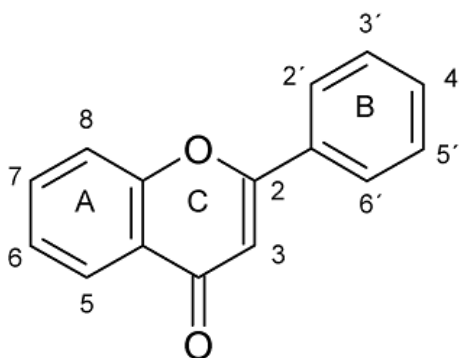


FIGURA 1.4 – Estrutura geral dos flavonoides.
Fonte: BEHLING, et al. (2004).

A estrutura ilustrada na Figura 1.4 pode sofrer reações químicas de hidroxilação, metilação, acilação, hidrogenação, glicosilação, entre outras, obtendo-se novas classes e compostos de flavonoides. Destacam-se as flavonas (apegenina, luteolina, diosmetina), flavonóis (quercetina, miracetina, kaempferol), flavanonas (naringina, hesperidina), flavanol, flavandiol, antocianidina, que podem totalizar mais de 4000 flavonoides diferentes identificados nas plantas (BEHLING et al., 2004; PERON et al., 2015).

Como afirmado por ZERAIK (2010), os flavonoides podem ocorrer na forma livre (agliconas) ou ligada a açúcares (glicosídeos). Os compostos *C-glicosilados*, isoorientina, orientina, isovitexina, vitexina são os mais comuns de serem identificados na no maracujá azedo, assim como a rutina e quercetina (Figura 1.5).

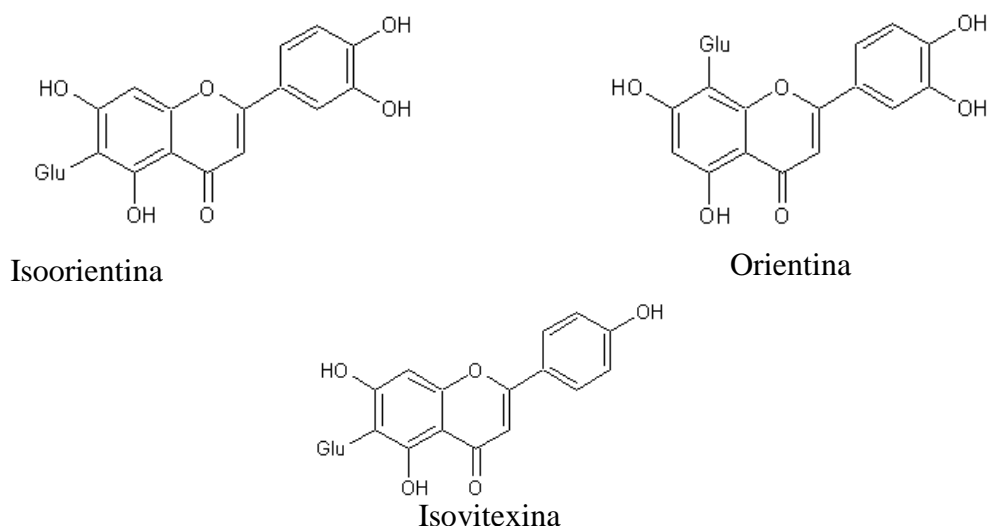


FIGURA 1.5 – Estrutura dos flavonoides estudados.
Fonte: Adaptado de GOMES (2013).

Os flavonoides apresentados na Figura 1.5 podem ser encontrados em diversas espécies do gênero *Passiflora* como relatado por LANGASSNER (2009) e WOSCHA et al. (2017). Dentre estas, estudos têm comprovado que a *P. edulis* possui flavonoides em quase todas as suas partes. Por exemplo: os autores KONTA et al. (2013), realizaram testes *in vivo* com flavonoides advindos da polpa, e demonstraram que eles são capazes de combater a hipertensão. De suas folhas, AYRES et al. (2015), verificaram as atividades ansiolíticas e antidepressivas, e das cascas os autores SENA (2009) e ZERAIK et al. (2012) avaliaram a capacidade antioxidante.

1.4. Química Analítica Verde

O período após a Segunda Guerra Mundial é considerado o ápice do desenvolvimento industrial e para atender a necessidade de consumo em escala global, desenvolveram-se produtos químicos sintéticos, muitos deles contendo reagentes e solventes prejudiciais ao ser humano e ao meio ambiente. Ainda hoje, o processo de fabricação gera resíduos tóxicos e, por isso antes do descarte deve-se realizar um tratamento. Uma vez que, o manuseio incorreto desses resíduos pode contaminar o solo, lençol freático, rios e lagos (FARIAS e FÁVARO, 2011; PRADO, 2003; SILVA et al., 2005). Diante desse contexto, a filosofia conhecida como QV assim como afirmado por LENARDÃO et al. (2003), surgiu na década de 1990, sendo definida por ANASTAS e WARNER (1998) e CORREA e ZUIN (2009) como “a criação, o desenvolvimento e a aplicação de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao

ambiente”. Para auxiliar a aplicação desse conceito, Paul Anastas e John Warner criaram os 12 Princípios da QV, conforme mostrado por LENARDÃO et al. (2003):

- 1) **Prevenção:** prevenir a formação de resíduo é melhor do que remediar;
- 2) **Economia de átomos:** os métodos sintéticos devem ser elaborados para incorporar todos os átomos dos reagentes no produto final;
- 3) **Sínteses com compostos de menor toxicidade:** sempre que possível, deve-se substituir nas reações químicas compostos de alta toxicidade por compostos de menor toxicidade;
- 4) **Desenvolvimento de compostos seguros:** os produtos químicos devem possuir a função desejada, apresentando a menor toxicidade possível;
- 5) **Diminuição de solventes e auxiliares:** a utilização de substâncias auxiliares (solventes, agentes de separação, etc.) devem ser evitadas sempre que possível, e quando utilizadas devem ser inócuas;
- 6) **Busca pela eficiência energética:** sempre que possível, deve-se conduzir os processos químicos à pressão e à temperatura ambientes;
- 7) **Uso de fontes renováveis:** os produtos e subprodutos de processos químicos deverão ser reutilizados, sempre que possível;
- 8) **Reduzir a formação de derivados:** quando possível, a derivatização (uso de grupos bloqueadores, proteção/desproteção, etc.) deverá ser minimizada ou evitada;
- 9) **Catálise:** a aplicação de catalisadores aumenta a velocidade e o rendimento dos processos;
- 10) **Desenvolvimento de compostos para degradação:** os produtos químicos precisam ser desenvolvidos, para que após o uso degradem em produtos inócuos;
- 11) **Análise em tempo real para a prevenção da poluição:** as metodologias analíticas precisam ser desenvolvidas para permitirem o monitoramento do processo em tempo real, para evitar ou controlar a formação de compostos tóxicos;
- 12) **Química segura para a prevenção de acidentes:** as substâncias usadas nos processos químicos deverão ser escolhidas para minimizar acidentes em potencial, tais como explosões e incêndios.

A Química Analítica Verde (QAV) encontra-se no âmbito dos 12 Princípios da QV, especialmente daqueles que têm maior aproximação às análises, a saber: a prevenção da formação de resíduos, redução do uso de solventes e auxiliares mais seguros, aumento da eficiência energética, e minimização do risco de acidentes químicos trabalhando com uma química mais segura. Desta forma a QAV, como destacado pelos autores KOEL e

KALJURAND (2006), KEITH et al. (2007) e NAMIEŚNIK (2001), será aplicada às etapas de preparo de amostra deste trabalho, que são os métodos de extração verdes.

1.5. Métodos de extração de produtos naturais a partir de amostras vegetais

Para a obtenção de compostos ativos das plantas, em geral realiza-se uma extração sólido-líquido, cujo método pode ser tanto a frio quanto a quente. Os exemplos mais comuns são a maceração (SILVA et al., 2013), percolação e ácido-base (MACIEL et al., 2002), refluxo (HOFFMANN-RIBANI e RODRIGUEZ-AMAYA, 2008), Soxhlet (PAIVA et al., 2002), entre outros. De maneira geral, estas metodologias demandam grande tempo de extração e consumo de solventes, implicando na geração de elevada quantidade de resíduos e misturas de solventes (e.g., clorofórmio, metanol), muitas vezes não atendendo à QV.

Desta forma, procedimentos considerados mais verdes empregam, sempre que necessário, e em quantidades diminutas solventes renováveis, não tóxicos, cujas extrações podem ocorrer através do ultra-turrax, ultrassom e microondas, as quais demonstram tempo de análise reduzido e alta eficiência (CHEMAT et al., 2017; YU et al., 2017; ZUIN e RAMIN, 2018). Comparados aos métodos descritos anteriormente, esses últimos atendem aos Princípios 1, 5, 6 e 12 da QV. E, para melhor detalhamento dos métodos de extração verde, a seguir, eles serão pontuados.

1.5.1. Método de extração sólido-líquido com homogeneização por ultra-turrax

O ultra-turrax (mixer) pode ser utilizado tanto para homogeneizar amostras quanto para método de extração tipo sólido-líquido (CARREIRA et al., 2009; HANOT et al., 2015; STANCIU et al., 2017). O ultra-turrax permite o controle da velocidade de agitação, podendo monitorar o tempo de extração. E, segundo XU et al. (2016), ao mesmo tempo em que homogeneiza a amostra ele também a pulveriza, destruindo a membrana celular do material vegetal e permitindo que o solvente entre em contato mais efetivo com os analitos, e consiga sua extração.

A execução desse método de extração é fácil e apresenta baixo custo. Porém, a técnica possui uma limitação para extrações acima de 10 minutos, já que o equipamento pode apresentar aquecimento, exigindo pausas entre uma extração e outra.

1.5.2. Método de extração sólido-líquido assistida por ultrassom

O equipamento ultrassom funciona da seguinte forma: quando ondas mecânicas com frequência maior do que 20 kHz se propagam no meio líquido, elas promovem o fenômeno de cavitação, ou seja, a formação de cavidades, que realizam diversos ciclos de expansão e compressão, gerando calor e elevando a pressão do sistema. Na matriz vegetal, a cavitação causa implosão assimétrica, provocando turbulência e causando colisões das microbolhas com a parede celular, rompendo a célula, aumentando o contato com o solvente e, conseqüentemente, a extração dos analitos. (CAVALHEIRO, 2013; FERREIRA, B. et al., 2014; FREITAS et al., 2015).

O banho de ultrassom é um equipamento comum e disponível na maior parte de laboratórios de química. Alguns modelos possuem maior precisão na regulagem de temperatura e potência, aumentando a confiabilidade nos resultados. Além disso, NASCENTES et al. (2001) observaram que a posição dos frascos dentro do banho de ultrassom pode causar uma maior variação dos resultados, devido a não uniformidade da cavitação.

Entretanto, quando comparado ao método de extração por ultra-turrax, o ultrassom não consegue pulverizar a amostra, não homogeneizando-a até o ponto de diminuir o tamanho da partícula e, assim, não aumentando a interação matriz vegetal com o solvente conforme discutido por XU et al. (2016).

1.5.3. Método de extração sólido-líquido por microondas

As microondas são ondas eletromagnéticas cuja frequência se dá entre 0,3 a 300 GHz, correspondendo no espectro à faixa entre o infravermelho e a radiofrequência. Para que seja possível a extração assistida por microondas, deve-se escolher um solvente polar e com alta constante dielétrica¹ (FILHO, 2016) para absorver o máximo de radiação microondas, resultando na transferência de energia das microondas para o solvente e a matriz vegetal, causando rompimento das células que contêm água, e liberando os analitos (CASS e CASSIANO, 2015; PROESTOS e KOMAITIS, 2008; TSUKUI e REZENDE, 2014).

Entretanto, comparado aos métodos de extração por ultra-turrax e ultrassom, o microondas pode ser considerado um equipamento de custo elevado por causa de suas especificidades, ao menos inicialmente. Também são necessários frascos específicos para a

¹ Por exemplo, a água, $\epsilon = 78,54$, e o etanol, $\epsilon = 24,30$

extração, transparentes à radiação de microondas (por exemplo, de Teflon). Isto significa que vidrarias disponíveis em laboratórios, como tubo falcon (utilizado na extração ultra-turrax) e tubo de vidro (no ultrassom) não são indicadas. Cabe pontuar ainda que alguns microondas possuem limitações, por exemplo, tipo de solventes a serem utilizados, sem oferecer riscos como explosões.

1.5.4. Quimiometria

A quimiometria iniciou-se no Brasil com maior ênfase na década de 1970, mas sua produção científica e aplicação intensificaram-se em meados dos anos 1980, com o surgimento e popularização dos computadores (NETO et al., 2006).

Quimiometria é uma disciplina química que emprega métodos estatísticos para planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada e para fornecer o máximo de informação química com a análise dos dados obtidos (FERREIRA, M. et al., 1999, p.724).

O planejamento fatorial de experimentos possibilita o estudo da variação de um conjunto de interações de variáveis, tanto no nível baixo quanto no nível alto de um determinado parâmetro. Desta forma, o planejamento otimiza os experimentos, reduzindo-os, e maximizando os resultados. Neste trabalho, por exemplo, ao aplicá-lo aos métodos de extração utilizados, economizou-se solvente, tempo de análise e demais recursos, sendo considerada uma técnica que atende aos Princípios da QV.

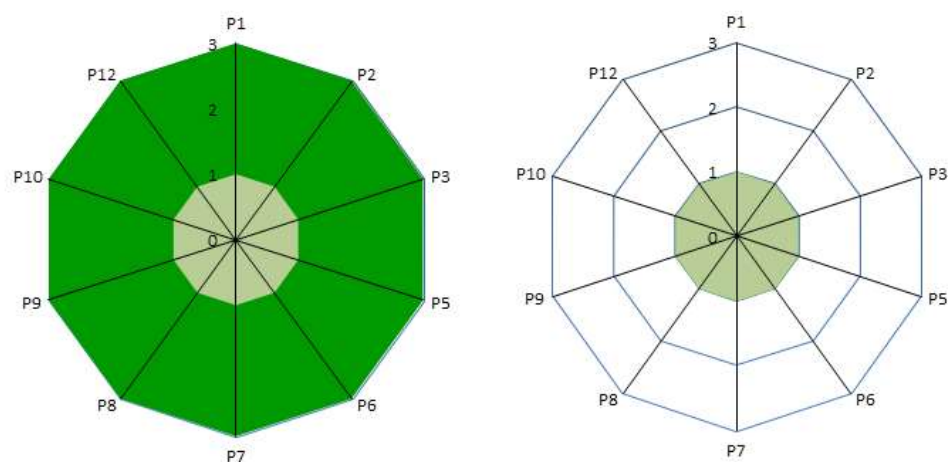
1.5.5. Métrica Estrela Verde

Para avaliar a presença da QV, tanto nas atividades laboratoriais quanto nas indústrias aplica-se o uso de métricas, que são ferramentas de avaliação para se obter uma metodologia verde. São exemplos: as métricas E-factor, economia atômica, eficiência da reação de massa, eficiência de carbono, impacto ambiental do solvente e catalisador, análise do ciclo de vida, entre outras (CONSTABLE et al., 2002; TOBISZEWSKI et al., 2015; SHELDON, 2018).

A métrica holística da Estrela Verde permite comparações visuais fáceis entre elementos como - a exemplo deste trabalho - os métodos de extração, podendo compará-los através do grau verde. RIBEIRO et al. (2010a) definem a métrica Estrela Verde como:

A métrica é constituída por uma estrela de tantas pontas quantos os Princípios da Química Verde em jogo no problema em análise, e em que o comprimento de cada ponta é tanto maior quanto melhor for o cumprimento do respectivo princípio, de modo que a área da estrela é tanto maior quanto maior for o grau verde global do processo químico em estudo (p.759).

O grau verde é a representação do preenchimento da Estrela, ou seja, de quanto o experimento está atendendo aos Princípios da QV. Desta forma, quando o experimento cumprir todos os Princípios, o preenchimento da Estrela será máximo, e, quando o experimento não cumprir nenhum Princípio, a Estrela não ficará preenchida, representando um baixo grau verde, como mostra a Figura 1.6 (RIBEIRO et al., 2010b).



a) Estrela com o máximo de grau verde.

b) Estrela com o mínimo de grau verde.

FIGURA 1.6. – Métrica Estrela Verde.

Fonte: RIBEIRO, et al. (2010b) e ZANDONAI (2013).

A vantagem da Estrela verde é que ela pode ser construída para qualquer experimento que tenha como objetivo atender aos 12 Princípios da QV, antes dele ser realizado. O resultado da análise visual através do grau verde permite alterações no procedimento obtendo um grau verde maior (ZANDONAI, 2013).

1.6. Técnica de análise

A seguir serão elencados dois tópicos que dizem respeito às técnicas de análises: *Ultra Performance Liquid Chromatography* – UPLC e validação do método analítico.

1.6.1. Ultra Performance Liquid Chromatography – UPLC

Segundo LANÇAS (2009) e SNYDER et al. (2010), em 1900, o botânico russo Mikhail S. Tswett iniciou os estudos na cromatografia líquida separando pigmentos de plantas

através de uma coluna empacotada utilizando solventes. Com o passar dos anos essa técnica foi aprimorada, deixando a análise mais rápida e eficiente, surgindo assim a *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) e em 1960, comercializou-se o primeiro equipamento de HPLC.

Após os anos 2000, a técnica HPLC foi redesenhada para *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC), consumindo menos solvente, tempo de análise e gerando menos resíduo. Para atingir este desempenho, desenvolveram-se novas colunas, com menores comprimento (5-10 cm) e diâmetro interno ($\leq 2,0 \mu\text{m}$) para a fase estacionária, proporcionando à fase móvel uma velocidade linear que aumentou a detectabilidade e a resolução, diminuindo o tempo de análise. Além disso, a pressão utilizada deste sistema é um pouco mais elevada do que a utilizada na técnica HPLC (acima de 15.000 psi). Desta forma, essa técnica pôde ser considerada uma técnica de identificação de compostos que visam atingir os 12 Princípios da QV - SWARTZ, (2005); JARDIM e MALDANER, (2012); ZOTOU, (2012). As separações analíticas de moléculas complexas, como os flavonoides, são predominantemente utilizadas em fase reversa, que se dá quando a fase móvel é mais polar do que a fase estacionária. A fase estacionária mais utilizada, a princípio, foi a C18 (octadecilsílica). Com o avanço tecnológico, passou a ser a sílica modificada (por exemplo: HSS C18, BEH). Ao final do processo de separação, o detector de arranjo de diodos gera um cromatograma através da varredura de comprimento de onda, ao contrário do detector de ultravioleta visível (UV-VIS) de comprimento de onda fixo, que lê um comprimento por vez (DEGANI et al., 1998; SNYDER et al., 2010).

1.6.2. Validação do método analítico

Como destacado anteriormente, o método cromatográfico desenvolvido através do UPLC-PDA tem sido amplamente utilizado na separação de moléculas complexas, como, por exemplo, os flavonoides. Para aumentar a confiabilidade dos resultados, realizou-se a validação do método analítico que demonstrou o melhor desempenho na extração dos analitos, sendo assim RIBANI et al. (2004) define a validação como:

Validação é a exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer. (p.771)

Além disso, para avaliar os resultados da validação utilizou-se o protocolo *International Conference on Harmonisation* (ICH), bem como os parâmetros (ZERAİK, 2010):

- **Especificidade:** avalia-se o quanto os analitos estão livres de impureza e interferentes.
- **Linearidade:** a partir de uma faixa, analisa-se a eficiência do método em fornecer uma resposta diretamente proporcional a concentração da substância na amostra.
- **Recuperação:** a partir do resultado encontrado através do método analisa-se o quanto ele está próximo do resultado verdadeiro.
- **Precisão:** a partir de uma série de medidas de uma mesma amostra, avalia-se a proximidade dos resultados obtidos.
- **Limite de Detecção (LD):** menor concentração que o método pode detectar os analitos, mas não obrigatoriamente quantificá-los.
- **Limite de Quantificação (LQ):** menor concentração que o método pode determinar dos analitos.

2. OBJETIVOS

Neste tópico são abordados os objetivos gerais e específicos que motivaram a realização desta pesquisa.

2.1. Objetivos gerais

Desenvolver, validar e aplicar métodos analíticos verdes para a extração dos flavonoides orientina, isorientina e isovitexina, a partir de resíduos de *Passiflora edulis Sims f. flavicarpa* Deg. (cascas de maracujá-azedo).

2.2. Objetivos específicos

- Estudar métodos de extração de flavonoides obtidos a partir de resíduos de *Passiflora edulis Sims f. flavicarpa* Deg, em ultra-turrax, ultrassom e microondas;
- Comparar os métodos estudados com base nos resultados do planejamento fatorial;
- Validar o método analítico que possibilitar os melhores rendimentos para a extração dos flavonoides selecionados;
- Separar e identificar dos flavonoides de interesse por meio da técnica de análise UPLC-PDA;
- Avaliar o caráter verde dos métodos estudados, por meio da métrica da Estrela Verde.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Neste tópico abordam-se as metodologias aplicadas a este trabalho. Assim, inicia-se descrevendo os equipamentos, materiais, padrões analíticos, reagentes e solventes utilizados, bem como o procedimento de preparo da casca do maracujá para análise. Os planejamentos fatoriais, o cálculo do gasto energético e a construção da métrica Estrela Verde também são descritos para os métodos analíticos verdes de extração, ultra-turrax, ultrassom e microondas. E, por fim, apresentam-se os parâmetros de validação aplicados ao melhor método de extração.

3.1. Equipamentos e materiais

Os equipamentos e materiais utilizados neste trabalho foram: estufa de fluxo de ar contínuo, liquidificador doméstico (Philco[®]), moinho analítico (IKA[®], modelo A11 basic), balança analítica (Mettler Toledo, modelo AB135-5/Fact), peneiras analíticas de 100 e 60 mesh (Granutest), ultra-turrax (IKA[®], modelo T10 Basic), ultrassom (Soni-tech), microondas (Berghof, Speedwave[®] DIRC, Alemanha), vórtex (IKA[®], modelo Lab Dancer) e centrífuga (Eppendorf[®], modelo 5810R). Para as análises dos analitos utilizou-se o cromatógrafo Acquity UPLC H-Class PDA QDA Waters[®] com o *software* Empower, e a pré-coluna e a coluna cromatográfica HSS C18 SB com 2,1 x 100 mm de diâmetro interno e tamanho da partícula de 1,8 µm (Acquity Waters[®]). O filtro hidrofóbico com porosidade de 0,22 µm (Analítica) de Politetrafluoretileno (PTFE) foi utilizado para filtrar as amostras.

3.2. Padrões analíticos, reagentes e solventes

Os padrões analíticos dos flavonoides analisados - isoorientina, orientina – foram obtidos da Sigma-Aldrich[®] com pureza > 95%. Já o padrão isovitexina foi obtido da HWI Pharma Solutions com 90,38% de pureza. As soluções padrões estoque foram preparadas em metanol (grau HPLC, Honeywell) e todas armazenadas a 4 °C.

Para a extração dos flavonoides na casca do maracujá foi utilizado etanol (grau HPLC, Panreac[®]) e água destilada. Na separação cromatográfica utilizou-se acetonitrila (grau HPLC, Tedia), metanol (grau HPLC, Honeywell), água ultrapura (sistema Mili-Q, Milipore[®]) e ácido fórmico (Sigma-Aldrich, ≤ 95%).

3.3.Preparo das amostras de *Passiflora edulis* Sims

As amostras de maracujá foram adquiridas no dia 30 de março de 2017, na cidade de São Carlos, no comércio local. Descascou-se, aproximadamente 30 frutos, separando-se a casca amarela (mesocarpo) da parte branca (epicarpo). A parte branca foi armazenada, mas não utilizada para fins de resultados dessa pesquisa, enquanto que a casca amarela foram colocadas para secar na estufa de circulação de ar por 7 dias a 35 °C. Após a secagem armazenou-as em um pote hermeticamente fechado e identificado. Essas foram, primeiramente, trituradas no liquidificador doméstico e, em seguida, no moinho. Com auxílio das peneiras de 100 e 60 mesh pôde-se determinar o tamanho da partícula. Após a peneiração da amostra, estas também foram armazenadas em um frasco hermeticamente fechado e identificado.

3.4.Desenvolvimento do método cromatográfico UPLC-PDA

Para a realização das análises cromatográficas desenvolveu-se um método cromatográfico utilizando-se a *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) acoplada ao detector *photodiode array* (PDA). Utilizou-se como fase móvel, a fase aquosa A, que consiste em água ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico (modificador orgânico), e a fase orgânica B, Acetonitrila (ACN). A fase estacionária utilizada foi a coluna HSS C18 SB na temperatura de 40 °C. A eluição ocorreu no modo gradiente com a vazão de 0,3 mL.min⁻¹. O volume de injeção da amostra foi de 1 µL. Selecionou-se o comprimento de onda em 330 nm.

3.5.Curva analítica

Para permitir a quantificação dos flavonoides nos extratos estudados, foram construídas curvas de calibração em solvente (metanol) para cada um dos analitos. Estudou-se 6 níveis de concentração (10, 25, 50, 100, 150 e 200 mg.L⁻¹), para cada analito (orientina, isoorientina, isovitexina) e as injeções foram feitas em triplicata (n = 3). Realizou-se o procedimento conforme descrito por RIBANI et al. (2004).

3.6.Método de extração por ultra-turrax

Para o preparo do extrato por ultra-turrax foi desenvolvido um planejamento fatorial utilizando como variáveis: razão amostra/solvente, proporção de etanol e tempo. Esse

planejamento está descrito no item 4.6.1.1. Para cada um dos experimentos a razão amostra/solvente (0,05 – 0,10) utilizada corresponde a massa pesada de amostra (0,25 – 0,5 g), em um tubo falcon de 20 mL, e extraída com 5 mL da solução hidroetanólica (30 – 70%) por um determinado tempo (2 – 8 min) com o auxílio de ultra-turrax, com rotação fixa no nível 3. Posteriormente, o conjunto de experimentos foi submetido à centrifugação por 20 min, a 20 °C e rotação de 10.000 rpm. O sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e filtrado em uma membrana politetrafluoretileno (PTFE) de 0,20 µm. Parte da solução foi armazenada a 4 °C e outra parte foi destinada a análise de UPLC.

3.6.1. Planejamento fatorial ultra-turrax

O planejamento fatorial proporciona a redução de quantidade de experimentos realizados evitando desperdício de recursos como solventes, tempo de equipamento, e da amostra em questão. Para este método de extração utilizou-se três variáveis em dois níveis (+1 e -1), conforme apresentado na Tabela 3.1.

TABELA 3.1 – Variáveis estudadas para o desenvolvimento do método de extração de flavonoides em resíduos de maracujá azedo por meio de ultra-turrax

Variáveis	Nível baixo	Nível alto
	-1	+1
Razão amostra/solvente	0,05	0,10
Proporção de etanol (%)	30	70
Tempo (min)	2	8

O planejamento fatorial completo do tipo 2^3 (expoente é a quantidade de variáveis avaliadas), composto por 8 experimentos foi aplicado na extração por ultra-turrax. Os experimentos destacados 2, 4 e 5 (marcados com asterisco) foram realizados em triplicata, conforme apresentado na Tabela 3.2.

TABELA 3.2 – Planejamento fatorial para a extração por meio do ultra-turrax

Experimentos	Razão amostra/solvente	Proporção etanol (%)	Tempo (min.)
1	-1	-1	-1
2*	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4*	1	1	-1
5*	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1

*Experimentos realizados em triplicata

3.7. Método de extração por ultrassom

Para o preparo dos extratos por meio do uso de ultrassom foi desenvolvido um planejamento fatorial utilizando como variáveis: razão amostra/solvente, proporção de etanol e tempo. Esse planejamento está descrito no item 4.6.2.1. Para cada um dos experimentos a razão amostra/solvente (0,05, 0,07 e 0,10) utilizada corresponde a massa pesada de amostra (0,25, 0,37 e 0,5 g) em um tubo de vidro de 20 mL, e extraída com 5 mL da solução hidroetanólica (30, 50 e 70 %) por um determinado tempo (15, 38 e 60 min), com potência fixa no nível 3. Posteriormente, o conjunto de experimentos foi tratado da mesma forma como descrito no item 3.6.1.

3.7.1. Planejamento fatorial ultrassom

Para este método de extração utilizou-se três variáveis em três níveis (-1, 0, +1), conforme apresentado na Tabela 3.3.

TABELA 3.3 - Variáveis estudadas para o desenvolvimento do método de extração de flavonoides em resíduos de maracujá azedo por meio do ultrassom.

Variáveis	Nível baixo	Ponto central	Nível alto
	-1	0	+1
Razão amostra/solvente	0,05	0,07	0,10
Proporção de etanol (%)	30	50	70
Tempo (min)	15	38	60

O planejamento fatorial completo do tipo 2^3 (expoente é a quantidade de variáveis avaliadas), composto por 8 experimentos, foi aplicado na extração por ultrassom. O experimento 9 (marcado com asterisco) foi realizado em triplicata, conforme apresentado na Tabela 3.4.

TABELA 3.4 – Planejamento fatorial para a extração por meio do ultrassom.

Experimentos	Razão amostra/solvente	Proporção etanol (%)	Tempo (min.)
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9*	0	0	0

*Experimento realizados em triplicata

3.8.Método de extração por microondas

Para o preparo do extrato por microondas foi desenvolvido um planejamento fatorial utilizando como variáveis: razão amostra/solvente, proporção de etanol, tempo e temperatura. Esse planejamento está descrito no item 4.6.3.1. Para cada um dos experimentos a razão amostra/solvente (0,05, 0,07 e 0,10) utilizada corresponde à massa pesada de amostra (0,35, 0,52 e 0,7 g) em um frasco de TFM™- PTFE (próprio para microondas), e adicionou-se 7 mL da solução hidroetanólica (30, 40 e 70 %) por um determinado tempo (5, 15 e 25 min), e temperatura (60, 90 e 120°C) no microondas. A potência e pressão foram fixas em 800 W e 30 bar, respectivamente. Também para este procedimento, as etapas sucessivas para a determinação dos analitos puderam ser vistas no item 3.6.1.

3.8.1. Planejamento fatorial microondas

Para este método de extração utilizou-se quatro variáveis em três níveis (-1, 0, +1), conforme apresentado na Tabela 3.5.

TABELA 3.5 - Variáveis estudadas para o desenvolvimento do método de extração de flavonoides em resíduos de maracujá azedo por meio do microondas.

Variáveis	Nível baixo -1	Ponto central 0	Nível alto +1
Razão amostra/solvente	0,05	0,07	0,10
Proporção de etanol (%)	30	40	50
Tempo (min)	5	15	25
Temperatura (°C)	60	90	120

O planejamento fatorial completo do tipo 2^4 (expoente é a quantidade de variáveis avaliadas), composto por 16 experimentos, foi aplicado na extração por microondas. O experimento 17 (marcado com asterisco) foi realizado em triplicata, conforme apresentado na Tabela 3.6.

TABELA 3.6 – Planejamento fatorial para a extração por meio do microondas.

Experimentos	Razão amostra/solvente	Proporção etanol (%)	Tempo (min.)	Temperatura (°C)
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1

7	-1	1	1	-1
8	1	1	-1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	-1	1
16	1	1	-1	1
17*	0	0	0	0

*Experimento realizados em triplicata.

3.9. Eficiência de extração e o gasto energético

A eficiência de extração foi calculada somando-se a quantidade extraída (mg.g^{-1}) dos flavonoides orientina, isoorientina e isovitexina, dos melhores experimentos, obtidos através dos métodos analíticos verdes, ultra-turrax, ultrassom e microondas.

Para calcular o gasto energético e o consumo da energia elétrica, de cada método de extração, converteu-se o tempo de extração para horas. E em seguida, pesquisou-se a potência de cada equipamento (Watts) no website do fabricante e/ou no próprio equipamento, e posteriormente multiplicaram-se os dois valores, obtendo a energia elétrica consumida (Watts. hora) no tempo de extração desejado.

3.10. Construção da Estrela Verde

Para avaliar se os métodos de extração atendem aos Princípios da QV aplicou-se a métrica holística da EV. Como descrito anteriormente RIBEIRO et al. (2010a) foram os primeiros a publicar em um artigo sobre esta métrica, que atualmente está “automatizada” e pode ser facilmente construída através de uma planilha no Excel² (em formato de tabela), a qual descreve-se, a seguir, um exemplo de passo a passo necessário para o abastecimento dessa tabela:

- 1) Realizar um levantamento nos métodos de extração sobre todos os reagentes, solventes, catalisadores, resíduos gerados, entre outros componentes;

²A partir das instruções, fornecidas pelo website <http://educa.fc.up.pt/catalogo/pt/construcao_ev>

2) Para cada substância listada analisar os riscos para a saúde, ambiente e físico através das fichas de segurança, colocando a pontuação conforme a Tabela 3.7;

TABELA 3.7 – Pontuação para os riscos físico, de saúde e do ambiente de acordo com o perigo de cada reagente.

Perigos		Pontuação (p)	Perigos		Pontuação (p)
H200	Físico	3	H330	Saúde	3
H201	Físico	3	H331	Saúde	3
H202	Físico	3	H332	Saúde	2
H203	Físico	3	H333	Saúde	2
H204:	Físico	2	H334	Saúde	3
H205	Físico	3	H335	Saúde	2
H220	Físico	3	H336	Saúde	2
H221	Físico	2	H340	Saúde	3
H222	Físico	3	H341	Saúde	3
H223	Físico	2	H350	Saúde	3
H224	Físico	3	H351	Saúde	3
H225	Físico	3	H360	Saúde	3
H226	Físico	2	H361	Saúde	3
H227	Físico	2	H362	Saúde	2
H228 (category 1)	Físico	3	H370	Saúde	3
H228 (category 2)	Físico	2	H371	Saúde	3
H229	Físico	2	H372	Saúde	3
H230	Físico	3	H373	Saúde	3
H231	Físico	2	H400	Ambiente	3
H240	Físico	3	H401	Ambiente	3
H241	Físico	3	H402	Ambiente	2
H242 (Type C & D)	Físico	3	H410	Ambiente	3
H242 (Type E & F)	Físico	2	H411	Ambiente	3
H250	Físico	3	H412	Ambiente	2
H251	Físico	3	H413	Ambiente	2
H252	Físico	2	H420	Ambiente	3
H260	Físico	3	EUH001	Físico	3
H261(category2)	Físico	3	EUH006	Físico	3
H261(category3)	Físico	2	EUH014	Físico	3
H270	Físico	3	EUH018	Físico	3
H271	Físico	3	EUH019	Físico	3
H272(category2)	Físico	3	EUH029	Saúde	3
H272(category3)	Físico	2	EUH031	Saúde	3
H280	Físico	2	EUH032	Saúde	3
H281	Físico	2	EUH044	Físico	3
H290	Físico	2	EUH059	Ambiente	3
H300	Saúde	3	EUH066	Saúde	2
H301	Saúde	3	EUH070	Saúde	3

H302	Saúde	2	EUH071	Saúde	3
H303	Saúde	2	EUH201	Saúde	3
H304	Saúde	3	EUH201A	Saúde	2
H305	Saúde	2	EUH202	Saúde	3
H310	Saúde	3	EUH203	Saúde	2
H311	Saúde	3	EUH204	Saúde	2
H312	Saúde	2	EUH205	Saúde	2
H313	Saúde	2	EUH206	Saúde	3
H314	Saúde	3	EUH207	Saúde	3
H315	Saúde	2	EUH208	Saúde	2
H316	Saúde	2	EUH209	Físico	3
H317	Saúde	2	EUH209A	Físico	2
H318	Saúde	3			
H319	Saúde	2			
H320	Saúde	2			

Fonte: EDUCA - CONSTRUÇÃO DA ESTRELA VERDE.

3) Para os princípios 7 e 10, utilizar a Tabela 3.7 para realizar a pontuação da Tabela 3.8.

TABELA 3.8 – Pontuação para degradabilidade e renovabilidade de cada composto

Características	Crítérios	Pontuação (p) Estrela verde
Degradabilidade	Não degradáveis e que não possam ser tratados para se obter a sua degradação em produtos de degradação inócuos	3
	Não degradáveis, mas que possam ser tratadas para se obter a sua degradação em produtos de degradação inócuos	2
	Degradáveis com produtos de degradação inócuos	1
Renovabilidade	Não renováveis	3
	Renováveis	1

4) Com todos os dados em mãos realizar a pontuação da EV através da Tabela 3.9, de modo que cada princípio vai adquirir uma pontuação 1 a 3, na qual 1 indica que o método de extração possui uma benignidade mínima e 3 a benignidade máxima para a saúde, ambiente e humano.

TABELA 3.9 – Tabela principal para a pontuação da métrica EV.

Princípios da Química Verde	Pontuação (p)	Critérios
P1 – Prevenção	3	Todos os resíduos são inócuos (p = 1, Tabela 3.7).
	2	Formação de pelo menos um resíduo que envolva perigo moderado para a saúde e ambiente (p = 2, Tabela 3.7, sem nenhum que envolva p = 3).
	1	Formação de pelo menos um resíduo que envolva perigo elevado para a saúde e ambiente (p = 3, Tabela 3.7).
P2 - Economia de átomos	3	Reações sem reagentes em excesso ($\leq 10\%$) e sem formação de coprodutos.
	2	Reações sem reagentes em excesso ($\leq 10\%$) e com formação de coprodutos.
	2	Reações com reagentes em excesso ($> 10\%$) e sem formação de coprodutos.
	1	Reações com reagentes em excesso ($> 10\%$) e com formação de coprodutos.
P3 – Sínteses com compostos de menor toxicidade	3	Todas as substâncias envolvidas são inócuas (p = 1, Tabela 3.7).
	2	As substâncias envolvidas apresentam perigo moderado para a saúde e ambiente (p = 2, Tabela 1, pelo menos para uma substância, sem substâncias com p = 3).
	1	Pelo menos uma das substâncias envolvidas apresenta perigo elevado para a saúde e ambiente (p = 3, Tabela 3.7).
P5 – Diminuição de solventes e auxiliares	3	Os solventes e as substâncias auxiliares não existem ou são inócuas (p = 1, Tabela 3.7).
	2	Os solventes e as substâncias auxiliares usadas envolvem perigo moderado para a saúde e ambiente (p = 2, Tabela 3.7, pelo menos para uma substância, sem substâncias com p = 3).
	1	Pelo menos um dos solventes ou uma das substâncias auxiliares usadas envolve perigo elevado para a saúde e ambiente (p = 3, Tabela 3.7).
P6 – Busca pela eficiência energética	3	Temperatura e pressão ambientais.
	2	Pressão ambiental e temperatura entre 0 °C e 100 °C que implique arrefecimento ou aquecimento.
	1	Pressão diferente da ambiental e/ou temperatura > 100 °C ou menor do que 0 °C.
P7 – Uso de fontes renováveis	3	Todos os reagentes/matérias-primas envolvidos são renováveis (p = 1, Tabela 3.8).
	2	Pelo menos um dos reagentes/matérias-primas envolvidos é renovável, não se considera a água (p = 1, Tabela 3.8).
	1	Nenhum dos reagentes/matérias-primas envolvidos é renovável, não se considera a água (p = 3, Tabela 3.8).
P8 – Reduzir a formação de derivados	3	Sem derivatizações ou com uma etapa.
	2	Usa-se apenas uma derivatização ou duas etapas.
	1	Usam-se várias derivatizações ou mais do que duas etapas
P9 – Catálise	3	Não usam-se catalisadores ou os catalisadores são inócuos (p = 1, Tabela 3.7)
	2	Utilizam-se catalisadores que envolvem perigo moderado para a saúde e ambiente (p = 2, Tabela 3.7)
	1	Utilizam catalisadores que envolvem perigo elevado para a saúde e ambiente (p = 3, Tabela 3.7)

P10 – Desenvolvimento de compostos para a degradação	3	Todas as substâncias envolvidas são degradáveis com os produtos de degradação inócuos (p = 1, Tabela 3.8).
	2	Todas as substâncias envolvidas que não são degradáveis podem ser tratados para obter a sua degradação com os produtos de degradação inócuos (p = 2, Tabela 3.8).
	1	Pelo menos uma das substâncias envolvidas não é degradável nem pode ser tratada para obter a sua degradação com produtos de degradação inócuos (p = 3, Tabela 3.8).
P12 – Química segura para a prevenção de acidentes	3	As substâncias envolvidas apresentam perigo baixo de acidente químico (p = 1, Tabela 3.7, considerando os perigos para a saúde e perigos físicos).
	2	As substâncias envolvidas apresentam perigo moderado de acidente químico (p = 2, Tabela 3.7, pelo menos para uma substância, considerando os perigos para a saúde e perigos físicos, e sem substâncias com p = 3).
	1	As substâncias envolvidas apresentam perigo elevado de acidente químico (p = 3, Tabela 3.7, considerando os perigos para a saúde e perigos físicos).

Fonte: Adaptado de RIBEIRO, et al., (2010a).

Observa-se que os princípios 4 (Desenvolvimento de compostos seguros) e 11 (Análise em tempo real para a prevenção da poluição) foram excluídos da métrica, pois não havia intenção de produzir novos produtos químicos, sendo eles mais focados para as atividades industriais. Após a codificação desenha-se a EV, o preenchimento em verde indica que tal princípio foi atendido com pontuação 3, e o preenchimento vermelho indica que ele perde pontuação sendo 2 ou 1. Assim, pode-se calcular o Índice de Preenchimento da Estrela (IPE) que representa o grau verde do método de extração através da divisão: área verde da estrela pela área verde da estrela de verdura máxima, e o resultado é multiplicado por 100%.

3.11. Validação do método analítico

Para aumentar a confiabilidade dos resultados obtidos, realizou-se uma validação do método analítico, para o melhor método de extração. Antes de realizar esse procedimento, otimizou-se o método cromatográfico descrito no item 3.4. Em seguida, baseou-se no ICH (2005) e RIBANI et al. (2004) para realizar as seguintes etapas da validação: especificidade, linearidade, recuperação, precisão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). A amostra utilizada para validar foi o extrato do experimento 8, do planejamento fatorial do ultra-turrax, conforme apresentado anteriormente nos itens 3.1 e 3.2.

3.11.1. Especificidade

A verificação de pureza dos analitos estudados no extrato pôde ser obtida pelo espectro do detector PDA, comparando-se a pureza dos picos em comparação ao espectro de cada padrão nos respectivos tempos de retenção diferentes para cada analito.

3.11.2. Linearidade

Para avaliar a linearidade construíram-se as curvas analíticas (solvente e extrato) em triplicata através do método da adição de padrão. Partiu-se de uma solução estoque mistura com os três analitos em estudo, orientina, isoorientina e isovitexina (metanol 100%). Os pontos selecionados para as curvas foram 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg.L⁻¹

3.11.3. Recuperação

Adicionou-se 400 µL de uma mistura de padrões nas concentrações 10, 20 e 40 mg.L⁻¹ (baixo, médio e alto da curva) na casca de maracujá previamente pesada em três falcons diferentes, antes de realizar o processo de extração. Em seguida, adicionou-se 4,6 mL da solução de 70% etanol, e realizou-se o processo de extração com o ultra-turrax. As demais etapas da extração foram realizadas conforme o item 3.6. Para as três concentrações estudadas realizaram-se três triplicata.

A recuperação pode ser determinada através da equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração média experimental} \cdot 100}{\text{Concentração teórica}}$$

3.11.4. Precisão

A precisão foi avaliada nas concentrações 10, 20 e 40 mg.L⁻¹ de uma mistura de padrões, a partir dos cálculos do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação, conforme representado na equação abaixo:

$$\text{DPR (\%)} = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média determinada}} \cdot 100$$

3.11.5. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Para calcular o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) utilizaram-se os parâmetros da curva analítica do extrato. Aplicando-se a fórmula:

$$\text{LD} = 3,3 \times \frac{S}{S} \qquad \text{LQ} = 10 \times \frac{S}{S}$$

Sendo:

s: estimativa do desvio padrão da resposta

S: coeficiente angular da curva analítica

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste tópico, apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos nesta pesquisa. Inicialmente, o desenvolvimento do método cromatográfico e a curva analítica, e em seguida, uma breve explicação da escolha das variáveis utilizadas nos métodos de extração estudados, além da apresentação dos resultados do planejamento fatorial, bem como a influência de cada variável utilizada. Ainda, é mostrada a avaliação do grau verde dos métodos através da métrica da Estrela Verde, e para o melhor método para a extração realizou-se uma validação do método analítico.

4.1. Desenvolvimento do método cromatográfico

Conforme observado na literatura a cromatografia líquida de fase reversa (na qual a fase móvel é mais polar do que a fase estacionária) e o modo gradiente de eluição são amplamente utilizados na identificação de flavonoides no maracujá, e a mistura de acetonitrila (ACN) e água acidificada (v/v) tem demonstrado uma separação eficiente. Segundo GOMES (2013) a utilização de soluções aquosas na fase móvel pode ionizar os flavonoides, entretanto acidificando-a suprime-se essa ionização, obtendo uma melhor retenção e resolução dos compostos.

Para identificar os flavonoides, orientina, isorientina e isovitexina, na casca do maracujá, desenvolveu-se um método cromatográfico no UPLC-PDA, aplicando-se como fase móvel A, água ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico, e fase móvel B, ACN, utilizando as substâncias padrões, conforme descrito nos itens 3.2 e 3.4, sendo o item 3.4 melhor representado na Tabela 4.1.

TABELA 4.1 – Método cromatográfico de UPLC - PDA desenvolvido para as análises das extrações.

Tempo (min)	% A	% B
0	90	10
25	10	90
27	0	100

A Figura 4.1 demonstra que no método cromatográfico, a fase proposta sofre uma variação de 10 - 90%, em 25 min de análise, sendo assim, a cada minuto variam-se 3,2 % de solvente orgânico.

Desta forma, aplicou-se o método cromatográfico (apresentado na Tabela 4.1) às soluções padrões dos flavonoides, orientina, isoorientina e isovitexina, a fim de se obter um perfil cromatográfico da amostra que continha os três compostos, bem como determinar o tempo de retenção de cada, como mostrado na Figura 4.1.

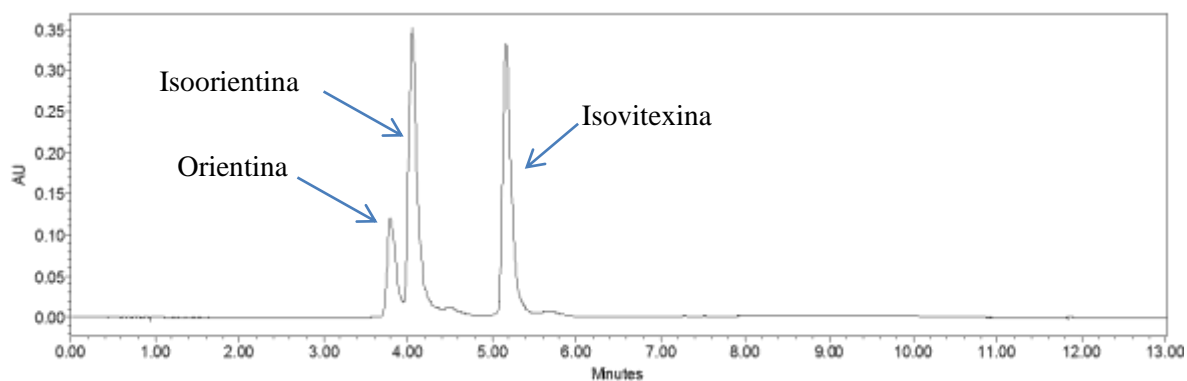
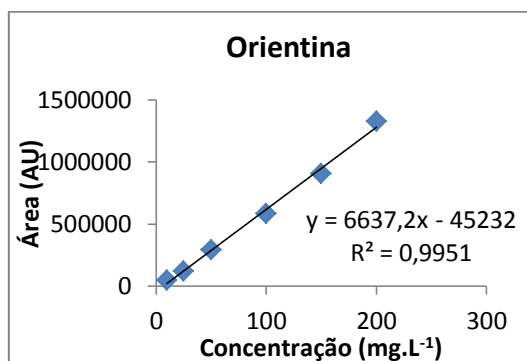


FIGURA 4.1 – Cromatograma obtido do UPLC-PDA em $\lambda=330\text{nm}$ dos padrões dos flavonoides estudados.

Observou-se na Figura 4.1 o perfil cromatográfico dos flavonoides estudados, bem como os tempos de retenção, sendo eles 3,792 (orientina), 4,048 (isoorientina) e 5,164 min (isovitexina).

4.2. Curva analítica

Para a quantificação dos flavonoides nos extratos construiu-se uma curva analítica no solvente conforme descrito no item 3.5. A Figura 4.2 ilustra os dados obtidos.



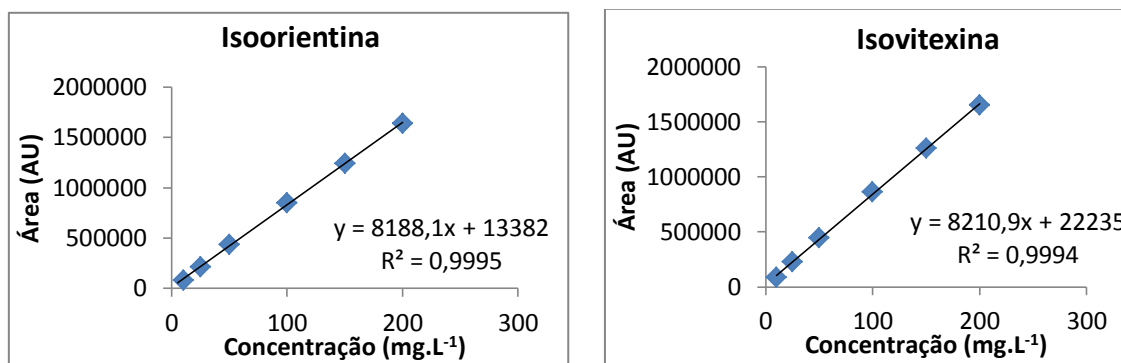


FIGURA 4.2 – Curvas analíticas no solvente dos flavonoides orientina, isoorientina, isovitexina.

De acordo com a Figura 4.2, observou-se que os coeficientes de correlação obtidos foram 0,9951 (orientina), 0,9995 (isoorientina), 0,9994 (isovitexina), para, e, respectivamente, indicando correlação linear entre a concentração dos padrões e os valores de área.

4.3. Escolha das variáveis para os métodos de extração

Os equipamentos utilizados nos métodos de extração por ultra-turrax, ultrassom e microondas possuem algumas características e limitações práticas, que foram levadas em consideração para a decisão de qual variável utilizar e o limite que poderia se atingir. O ultra-turrax é um equipamento simples, e ao utilizá-lo para a extração pode-se ter o controle da velocidade de agitação e o tempo (cronômetro), entretanto quando o tempo ultrapassa 10 min, o equipamento apresenta aquecimento. Já com o ultrassom pode controlar apenas o tempo (no equipamento) e fixar a potência em um nível, pois não há possível realizar o ajuste fino em relação às outras funções, por exemplo, temperatura. Finalmente o microondas, possui a limitação do fabricante para algumas funções, como por exemplo, proporção de etanol; a temperatura e potência são passíveis de alteração, e a pressão é constante. De modo geral, após a realização de alguns testes preliminares, decidiu-se trabalhar com as variáveis: razão amostra/solvente, proporção de etanol, tempo e temperatura. Com a inclusão da QV nos trabalhos acadêmicos, a variável razão amostra/solvente foi avaliada a fim de gerar menos resíduo, com o objetivo de extrair mais flavonoide com menos solvente, desta forma, utilizou-se um volume mínimo para a realização de cada extração, sendo 5 mL para o ultra-turrax e ultrassom e 7 mL para o microondas. Atualmente, os métodos de extrações estão substituindo os solventes

considerados tóxicos, como por exemplo, metanol, clorofórmio e diclorometano, pelo etanol que é considerado um solvente verde, renovável e, além disso, biodegradável.

NORIEGA et al. (2010) realizaram um estudo de extração de flavonoides das folhas de duas espécies de maracujá, a *Passiflora alata* Curtis e *Passiflora edulis* Sims, aplicando-se proporções hidroetanólicas diferentes em dois métodos de extração comuns: a maceração e a percolação. Comparando-se a eficiência de extração, a *Passiflora edulis* Sims apresentou um melhor desempenho quando utiliza-se o método da maceração e a proporção de etanol na faixa de 50 - 75%, sendo 75% a proporção ótima de extração, tendo em vista que ao aumentar a proporção de etanol atingindo 100%, foi observado uma queda nos valores de extração. Os autores também utilizaram um planejamento de experimentos para otimizar a etapa experimental do estudo.

Para os métodos de extração aplicados neste trabalho, utilizou-se uma faixa de 30 - 70% de proporção de etanol para o ultra-turrax e ultrassom, e 30 - 50% para o microondas, pois se há a limitação do fabricante, permitindo utilizar no máximo 50% de proporção de etanol. As demais variáveis como o tempo e temperatura, utilizou-se no ultra-turrax uma faixa de 2 - 8 min, para o equipamento não apresentar aquecimento, e no ultrassom utilizou-se uma faixa maior 15 - 60 min; a temperatura foi avaliada somente no microondas na faixa de 60 - 120 °C tomando o cuidado para os compostos não degradarem.

4.4.Extração por ultra-turrax

Para apresentar a extração por ultra-turrax escolhe-se apresentá-la em três momentos: planejamento fatorial do ultra-turrax; influência das variáveis; e perfil cromatográfico do extrato.

4.4.1. Planejamento fatorial ultra-turrax

De maneira geral, quando se observa a existência de 2 a 4 variáveis em um experimento recomenda-se o uso do planejamento fatorial completo. O fatorial 2^k (no qual k é o número de variáveis a serem avaliadas) representa a quantidade de experimentos a serem realizados, o qual aumenta exponencialmente conforme as variáveis aumentam (PEREIRA, 2015). O planejamento fatorial para o método baseado no uso de ultra-turrax foi realizado conforme descrito nos itens 3.6 e nos subitens 3.6.1 e 3.6.2. Neste caso, alteraram-se três variáveis, a saber: razão amostra/solvente, proporção de etanol e o tempo, em dois níveis diferentes, nível alto (+1) e nível baixo (-1), obtendo-se um planejamento do tipo 2^3 , composto por 8 experimentos. Os experimentos destacados 2, 4 e 5 (marcados

com asterisco) foram realizados em triplicata. A Tabela 4.2 mostra os resultados deste planejamento após a extração.

TABELA 4.2 – Quantidade de compostos extraídos do ultra-turrax ($\text{mg.g}^{-1} \pm \text{DP}$)

Exp	Razão amostra/solvente	Proporção etanol	Tempo	Orientina	Isoorientina	Isovitexina
1	-1	-1	-1	$0,74 \pm 0,02$	$0,86 \pm 0,02$	$0,23 \pm 0,01$
2*	1	-1	-1	$0,69 \pm 0,02$	$0,75 \pm 0,02$	$0,23 \pm 0,01$
3	-1	1	-1	$0,85 \pm 0,02$	$1,03 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,01$
4*	1	1	-1	$0,90 \pm 0,02$	$1,07 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,01$
5*	-1	-1	1	$0,75 \pm 0,02$	$0,87 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,01$
6	1	-1	1	$0,73 \pm 0,02$	$0,79 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,01$
7	-1	1	1	$0,90 \pm 0,02$	$1,07 \pm 0,02$	$0,32 \pm 0,01$
8	1	1	1	$0,94 \pm 0,02$	$1,11 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,01$

*Experimento realizado em triplicata.

Observa-se na Tabela 4.2 a quantidade extraída dos flavonoides encontrados neste método de extração, que foi calculada com auxílio das equações de reta apresentada no item 4.2, seguida de uma conversão para mg.g^{-1} . Através dos valores das triplicata calculou-se o desvio padrão, obtendo-se o erro para a extração de cada flavonoide.

4.4.2. Influência das variáveis

Para avaliar a influência das variáveis, os valores obtidos na Tabela 4.2 foram multiplicados pelos valores codificados do planejamento fatorial, em seguida somou-os, obtendo o valor de efeito. Após este tratamento de dados, avaliaram-se as interações principais, sendo 1, 2 e 3, e as interações secundárias 12, 13 e 23, ou seja, 1, representa a variável razão amostra solvente e 2 e 3, as variáveis proporção de etanol e o tempo, respectivamente.

A Tabela 4.3 ilustra os valores obtidos do cálculo de efeito, bem como a porcentagem de influência e interações das variáveis, para os flavonoides orientina, isoorientina e isovitexina. Através destes cálculos, as Figuras 4.3 e 4.4, ilustram qual a influência das variáveis estudadas no método de extração por ultra-turrax.

TABELA 4.3 – Influência das variáveis: 1, razão amostra/solvente 2; proporção de etanol; e 3 tempo no ultra-turrax

Efeito	Variáveis	Orientina			Isoorientina			Isovitexina		
		Efeito (E)	(E) ²	Influência (%)	Efeito (E)	(E) ²	Influência (%)	Efeito (E)	(E) ²	Influência (%)
Primário	1	0,02	0,00	0,07	- 0,08	0,01	0,63	0,03	0	0,84
	2	0,68	0,46	90,85	0,98	0,97	91,9	0,33	0,11	91,18
	3	0,13	0,02	3,25	0,12	0,01	1,3	0,07	0,00	3,94
Secundário	12	0,17	0,03	5,39	0,25	0,06	5,79	0,06	0,00	2,86
	13	0,02	0,00	0,05	0,02	0,00	0,03	- 0,02	0,00	0,37
	23	0,04	0,00	0,4	0,06	0,00	0,36	- 0,03	0,00	0,82
Soma		0,51			1,05			0,12		

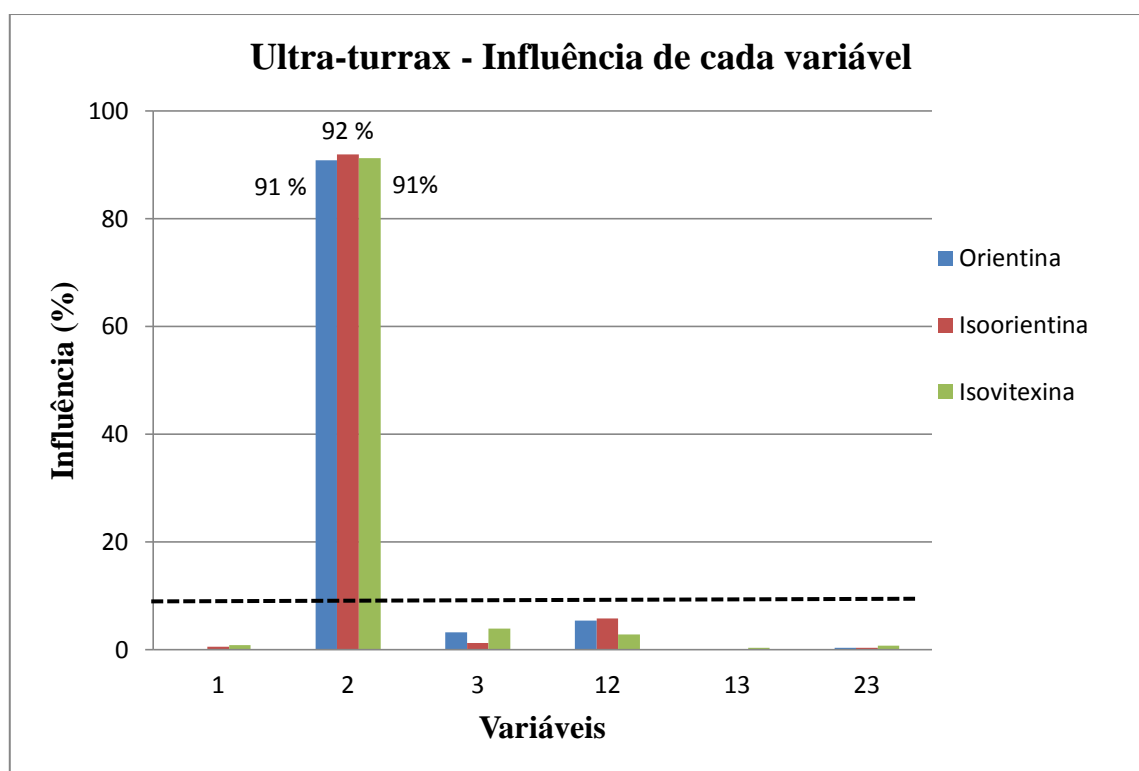


FIGURA 4.3 – Porcentagem da influência das variáveis para o ultra-turrax

Os valores de porcentagem de influência destacados na Tabela 4.3 são melhores representados na Figura 4.3. Quando a influência é abaixo de 10%, considera-se que não possui um efeito significativo no sistema. Desta forma, a variável 2 (proporção de etanol) demonstrou uma maior influência em relação às demais, sendo responsável por aproximadamente 91% dos efeitos do sistema, ou seja, é a variável com efeito mais significativo para obter a melhor condição de extração para orientina, isoorientina e isovitexina.

Além disso, para completar a análise dos resultados da extração por ultra-turrax, a Figura 4.4 ilustra os efeitos positivo e negativo das variáveis analisadas nesta extração.

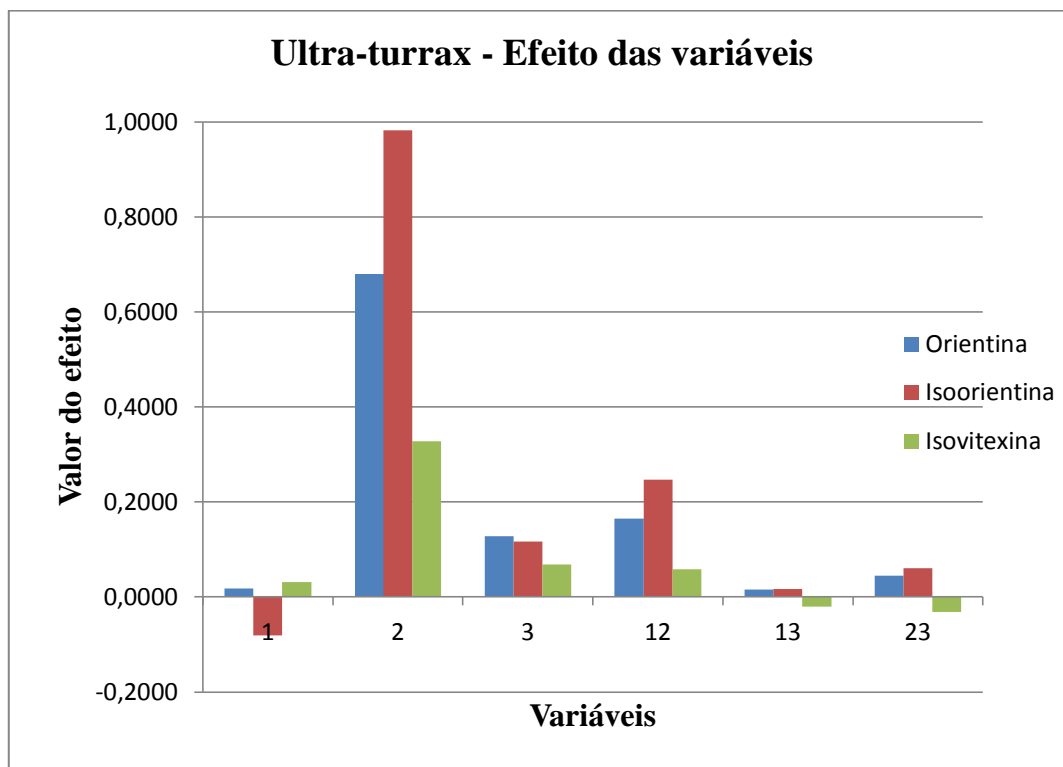


FIGURA 4.4 – Efeito positivo e negativo das variáveis para o ultra-turrax

Observa-se na Figura 4.4, a representação dos valores de efeito, se são positivos ou negativos, ou seja, para a variável 2, os valores para ambos os flavonoides são positivos, significado que quanto maior a proporção de etanol no método de extração do ultra-turrax maior será a quantidade extraída dos flavonoides estudados.

Isso pode ser observado nos experimentos 3, 4, 7 e 8 da Tabela 4.4, que também mostram as outras condições que não favorecerem a extração dos três analitos.

TABELA 4.4 – Melhores condições para a extração do ultra-turrax (mg.g ± DP)

Exp	Razão amostra/solvente	Proporção etanol (%)	Tempo (min)	Orientina	Isoorientina	Isovitexina
1	0,05	30 EtOH	2	0,74 ± 0,02	0,86 ± 0,02	0,23 ± 0,01
2*	0,10	30 EtOH	2	0,69 ± 0,02	0,75 ± 0,02	0,23 ± 0,01
3	0,05	70 EtOH	2	0,85 ± 0,02	1,03 ± 0,02	0,31 ± 0,01
4*	0,10	70 EtOH	2	0,90 ± 0,02	1,07 ± 0,02	0,33 ± 0,01
5*	0,05	30 EtOH	8	0,75 ± 0,02	0,87 ± 0,02	0,27 ± 0,01
6	0,10	30 EtOH	8	0,73 ± 0,02	0,79 ± 0,02	0,25 ± 0,01
7	0,05	70 EtOH	8	0,90 ± 0,02	1,07 ± 0,02	0,32 ± 0,01
8	0,10	70 EtOH	8	0,94 ± 0,02	1,11 ± 0,02	0,34 ± 0,01

*Experimento realizado em triplicata

A Tabela 4.4 mostra os experimentos que possuem alta e baixa eficiência de extração dos flavonoides estudados. Desta forma, o experimento 2 foi o que menos extraiu os três analitos. Nele utilizou-se uma proporção de etanol que corresponde a 30%, nível baixo aplicado ao planejamento, e extraiu apenas $0,69 \pm 0,020$, $0,75 \pm 0,021$ e $0,23 \pm 0,007$ mg.g⁻¹ dos analitos orientina, isoorientina e isovitexina respectivamente. Os experimentos 3, 4, 7 e 8 foram os que apresentaram o maior rendimento de extração. Neles utilizou-se a proporção de etanol que corresponde a 70%, nível alto aplicado ao planejamento. Dentre eles, o experimento 8 se destacou, extraindo a maior quantidade dos três analitos, cujos valores são $0,94 \pm 0,020$, $1,11 \pm 0,021$ e $0,34 \pm 0,007$ mg.g⁻¹ dos analitos orientina, isoorientina e isovitexina respectivamente. Ao comparar os valores máximo e mínimo da eficiência de extração, nos experimentos 2 e 8 tem-se que a mudança da proporção de etanol aumentou a extração de aproximadamente 32 % para a orientina e isoorientina, e 28% para a isovitexina.

Desta forma, a melhor condição para extrair os três flavonoides no método de extração por ultra-turrax é aplicando-se o experimento 8 (0,10 de razão amostra/solvente, 70% proporção de etanol e o tempo de 8 minutos).

4.4.3. Perfil cromatográfico do extrato de maracujá azedo obtido por ultra-turrax

Para identificar o perfil cromatográfico do método de extração por ultra-turrax, bem como os analitos presentes na casca da *P. edulis*, realizou-se os procedimentos descritos no item 3.6, e nos subitens 3.6.1 e 3.6.2.

Dentre os experimentos realizados no método de extração por ultra-turrax, observou-se que os cromatogramas são muito semelhantes. Desta forma, o cromatograma

do experimento 8, por razões discutidas anteriormente, foi o escolhido para representar o perfil dos analitos presentes na casca da *P.edulis*, conforme ilustrado na Figura 4.5. E ainda, na Figura 4.6 ilustra-se as absorções no UV-Vis obtidas no tempo de retenção demonstradas na Figura 4.5.

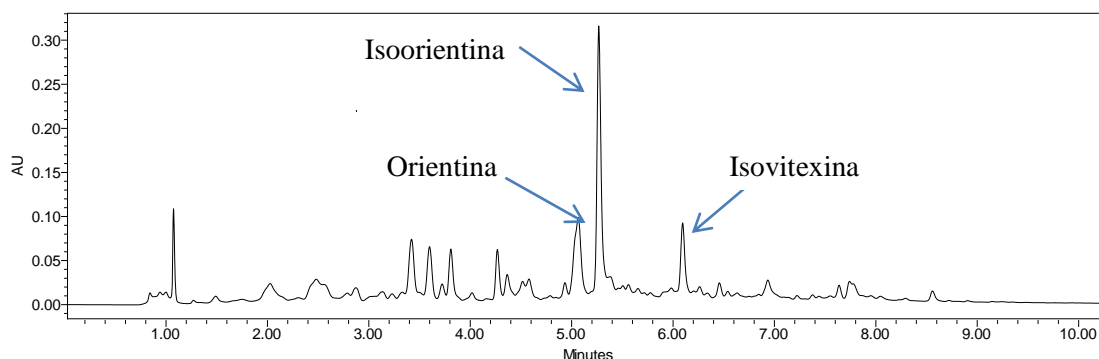
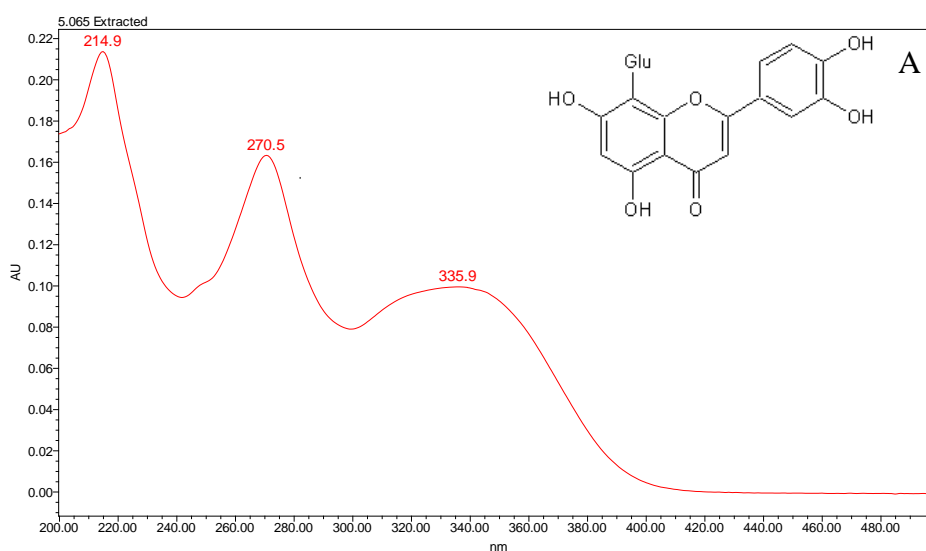


FIGURA 4.5 – Perfil cromatográfico do ultra-turrax (experimento 8) da casca de maracujá azedo em $\lambda=330$ nm.

Observou-se na Figura 4.5 os analitos que foram identificados nas condições estudadas deste método de extração, bem como os tempos de retenção, sendo: 5.065 min (orientina), 5.268 min (isoorientina) e 6.095 min (isovitexina).

A Figura 4.6 mostra os espectros de absorção no UV-Vis no comprimento de onda em 330 nm do experimento 8 da extração por ultra-turrax, sendo orientina (A), isoorientina (B) e isovitexina (C).



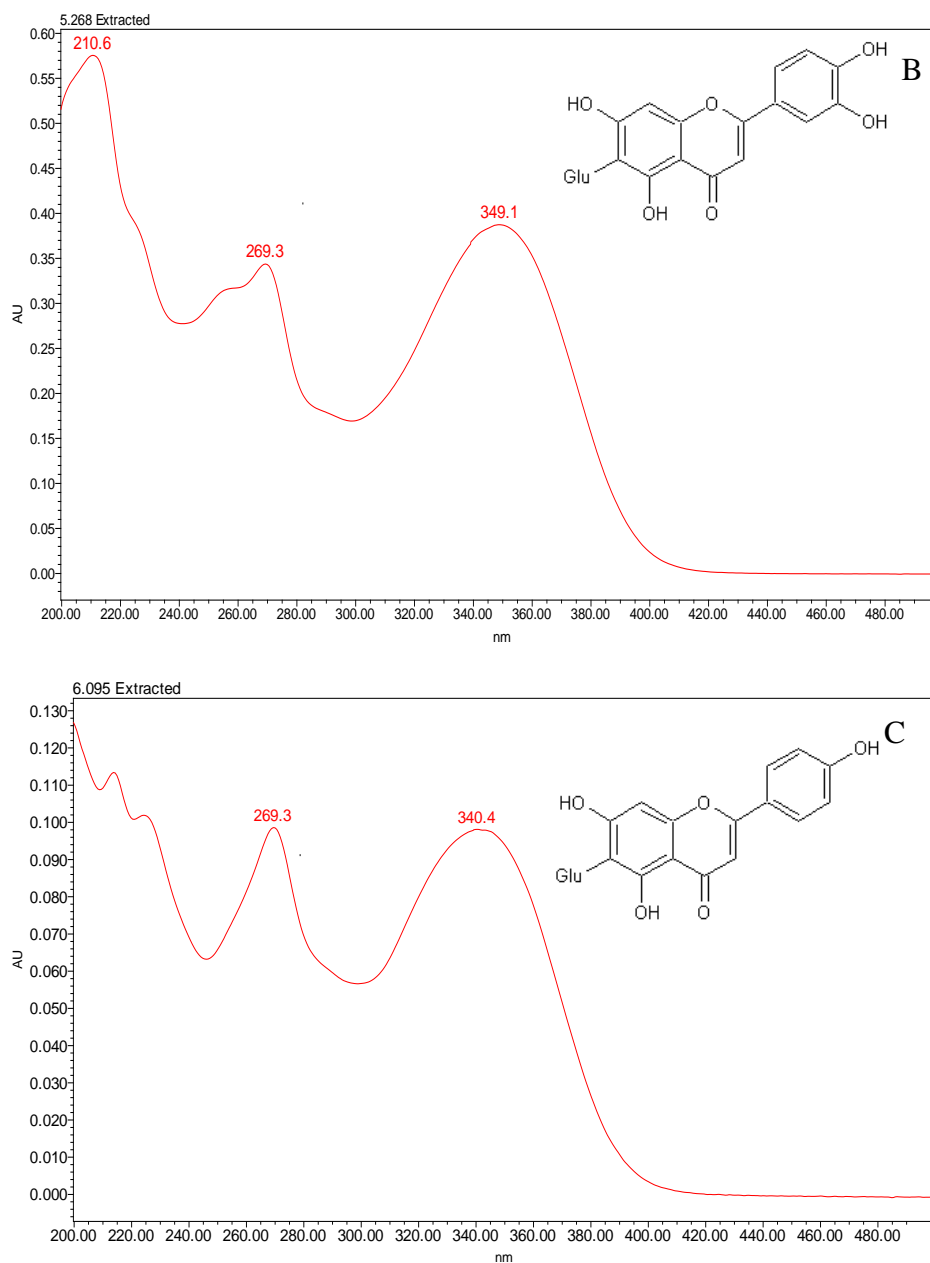


FIGURA 4.6 – Espectros de absorção no UV-Vis em $\lambda=330$ nm do experimento 8 ultra-turrax dos analitos orientina (A), isoorientina (B) e isovitexina (C) nos tempos de retenção correspondentes.

Baseado nos dados apresentados no item 4.1, e através das Figuras 4.5 e 4.6, pôde-se concluir que as condições estudadas e selecionadas no método de extração por ultra-turrax permitiram a extração de 3 analitos: orientina, isoorientina e isovitexina.

4.5.Extração por ultrassom

Para elucidar a extração do ultrassom serão apresentados 3 tópicos: planejamento fatorial ultrassom; influência das variáveis; e perfil cromatográfico do extrato obtido através do ultrassom

4.5.1. Planejamento fatorial ultrassom

O planejamento fatorial para o método baseado no uso de ultrassom foi realizado conforme descrito nos itens 3.7, e nos subitens 3.7.1 e 3.7.2. Neste caso, alterou-se três variáveis, a saber: razão amostra/solvente, proporção de etanol e o tempo, em três níveis diferentes, nível alto (+1), ponto central (0) e nível baixo (-1), obtendo-se um planejamento do tipo 2³, composto por 8 experimentos. O experimento 9 foi realizado em triplicata. A Tabela 4.5 mostra os resultados deste planejamento após a extração.

TABELA 4.5 – Quantidade de compostos extraídos do ultrassom (mg.g⁻¹ ± DP)

Exp	Razão amostra/solvente	Proporção etanol	Tempo	Orientina	Isoorientina	Isovitexina
1	-1	-1	-1	0,70 ± 0,03	0,68 ± 0,03	0,17 ± 0,00
2	1	-1	-1	0,23 ± 0,03	0,22 ± 0,03	0,06 ± 0,00
3	-1	1	-1	0,54 ± 0,03	0,58 ± 0,03	0,14 ± 0,00
4	1	1	-1	0,11 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,03 ± 0,00
5	-1	-1	1	0,68 ± 0,03	0,68 ± 0,03	0,18 ± 0,00
6	1	-1	1	0,34 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,09 ± 0,00
7	-1	1	1	0,55 ± 0,03	0,59 ± 0,03	0,15 ± 0,00
8	1	1	1	0,17 ± 0,03	0,18 ± 0,03	0,05 ± 0,00
9*	0	0	0	0,57 ± 0,03	0,57 ± 0,03	0,15 ± 0,00

*Experimento realizado em triplicatas

Observa-se na Tabela 4.5 a quantidade extraída dos flavonoides encontrados nesta extração. A quantidade extraída foi calculada com auxílio das equações de reta apresentada no item 4.2, seguida de uma conversão para mg.g⁻¹. Através dos valores das triplicata calculou-se o desvio padrão, obtendo-se o erro para a extração de cada flavonoide.

4.5.2. Influência das variáveis

Para avaliar a influência das variáveis, multiplicaram-se as respostas obtidas pelos valores codificados do planejamento fatorial, conforme a Tabela 4.5, em seguida somou-os, obtendo os valores de efeito. Após este tratamento de dados, avaliaram-se as interações principais, sendo 1, 2 e 3, e as interações secundárias 12, 13 e 23, ou seja, 1, representa a variável razão amostra solvente e 2 e 3, as variáveis proporção de etanol e o tempo, respectivamente.

A Tabela 4.6 ilustra os valores obtidos do cálculo de efeito, bem como a porcentagem de influência das variáveis e interações para os flavonoides isoorientina, isovitexina e orientina. Através destes cálculos, as Figuras 4.7 e 4.8, ilustram qual a influência das variáveis estudadas no método de extração por ultrassom.

TABELA 4.6 – Influência das variáveis: 1, razão amostra/solvente 2; proporção de etanol; e 3 tempo no ultrassom

Efeito	Variáveis	Orientina			Isoorientina			Isovitexina		
		Efeito (E)	(E) ²	Influência (%)	Efeito (E)	(E) ²	Influência (%)	Efeito (E)	(E) ²	Influência (%)
Primário	1	- 1,61	2,61	86,91	- 1,7	2,89	93,05	- 0,41	0,17	86,06
	2	- 0,58	0,34	11,23	- 0,41	0,17	5,33	- 0,15	0,02	10,86
	3	0,16	0,03	0,88	0,16	0,03	0,85	0,07	0,00	2,16
Secundário	12	0,01	0,00	0	- 0,04	0,00	0,06	- 0,02	0,00	0,11
	13	0,17	0,03	0,96	0,15	0,02	0,7	0,04	0,00	0,69
	23	- 0,02	0,00	0,02	- 0,02	0,00	0,02	- 0,02	0,00	0,11
Soma		3,00			3,11			0,20		

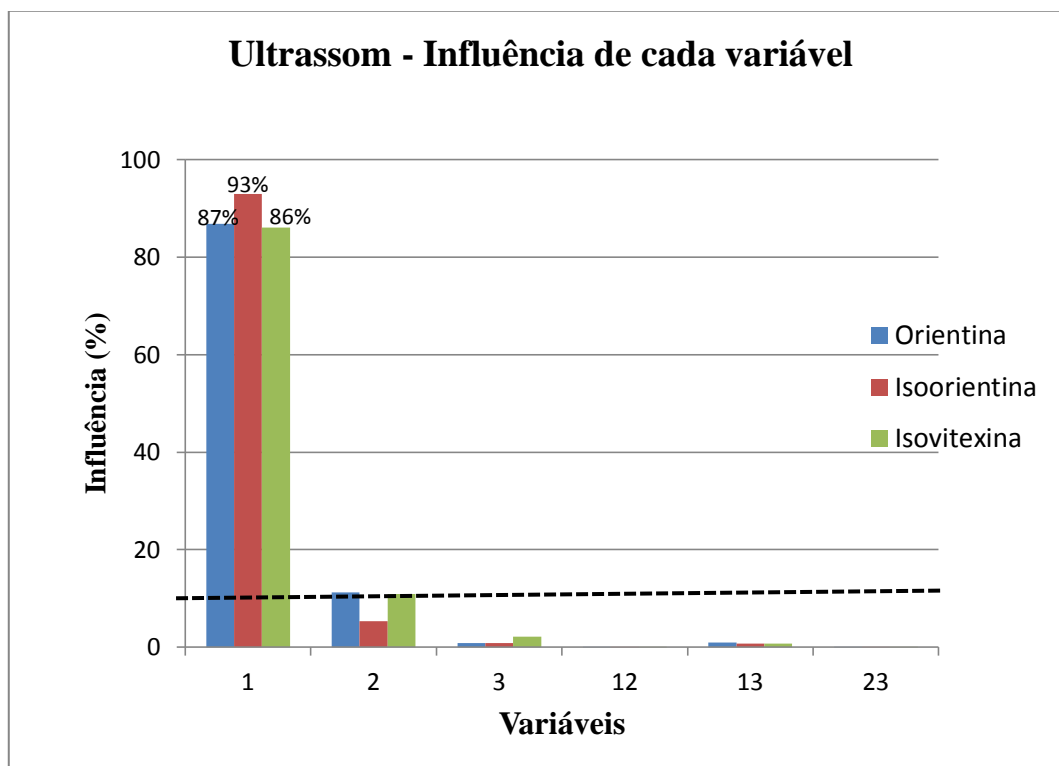


FIGURA 4.7 – Porcentagem da influência das variáveis para o ultrassom

Os valores de porcentagem de influência destacados na Tabela 4.6 são melhores representados na Figura 4.7. Quando a influência é abaixo de 10%, considera-se que não possui um efeito significativo no sistema. Desta forma, a variável 1 (razão amostra/solvente) demonstrou maior influência em relação às demais, sendo responsável por aproximadamente entre 86 - 93% no sistema, ou seja, é a variável com efeito mais significativo para obter a melhor condição de extração para orientina, isoorientina e isovitexina.

Além disso, para completar a análise dos resultados da extração por ultrassom, a Figura 4.8 ilustra os efeitos positivo e negativo das variáveis analisadas nessa extração.

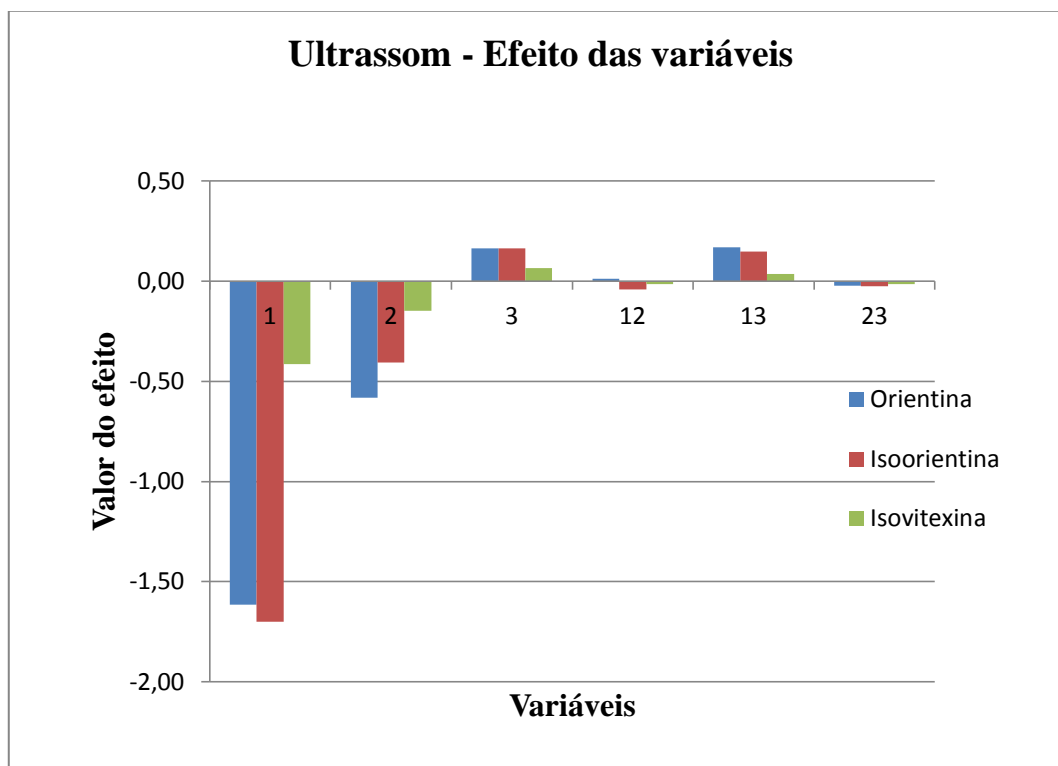


FIGURA 4.8 – Efeito positivo e negativo das variáveis para o ultrassom

Observa-se na Figura 4.8 a representação dos valores de efeito, se são positivos ou negativos, ou seja, para a variável 1 os valores de ambos os flavonoides são negativos, significando que quanto menor a razão amostra/solvente, maior será a quantidade extraída dos flavonoides estudados. Isso pode ser observado também nos experimentos 3 e 4 da Tabela 4.7, na qual a proporção de etanol e o tempo são as mesmas (70% EtOH, 15 min) e além disso pode ser observado também na razão amostra/solvente do experimento 3 e 4 que equivalem a 0,05 e 0,10, respectivamente. Assim, alterando somente a variável significativa, observa-se que o experimento 3 apresentou uma eficiência maior de extração dos analitos orientina, isoorientina e isovitexina, $0,54 \pm 0,025$, $0,58 \pm 0,027$, $0,14 \pm 0,005$ em mg.g^{-1} , do que o experimento 4, $0,11 \pm 0,025$, $0,12 \pm 0,027$, $0,03 \pm 0,005$ e mg.g^{-1} , respectivamente, havendo um aumento de aproximadamente 79% na eficiência de extração. Assim conclui-se que o experimento 4 é o experimento que menos extraiu os três analitos.

TABELA 4.7 – Melhores condições para a extração do ultrassom (mg.g ± DP)

Exp	Razão amostra/solvente	Proporção etanol (%)	Tempo (min)	Orientina	Isoorientina	Isovitexina
1	0,05	30 EtOH	15	0,70 ± 0,03	0,68 ± 0,03	0,17 ± 0,00
2	0,1	30 EtOH	15	0,23 ± 0,03	0,22 ± 0,03	0,06 ± 0,00
3	0,05	70 EtOH	15	0,54 ± 0,03	0,58 ± 0,03	0,14 ± 0,00
4	0,1	70 EtOH	15	0,11 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,03 ± 0,00
5	0,05	30 EtOH	60	0,68 ± 0,03	0,68 ± 0,03	0,18 ± 0,00
6	0,1	30 EtOH	60	0,34 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,09 ± 0,00
7	0,05	70 EtOH	60	0,55 ± 0,03	0,59 ± 0,03	0,15 ± 0,00
8	0,1	70 EtOH	60	0,17 ± 0,03	0,18 ± 0,03	0,05 ± 0,00
9*	0,07	50 EtOH	38	0,57 ± 0,03	0,57 ± 0,03	0,15 ± 0,00

A Tabela 4.7 também ilustra os experimentos que possuem uma maior e menor eficiência de extração dos flavonoides. Desta forma, conforme apresentado anteriormente o experimento 4 é o experimento que menos extraiu os 3 analitos juntos. Já o experimento 1 é o melhor experimento para extrair os analitos, no qual a variável 1, a razão amostra/solvente, corresponde a 0,05, nível baixo aplicado ao planejamento, extraindo $0,70 \pm 0,025$, $0,68 \pm 0,027$, e $0,17 \pm 0,005$ em mg.g^{-1} dos flavonoides orientina, isoorientina e isovitexina, respectivamente. Assim, ao utilizar todas as variáveis no nível baixo (exp.1) obteve-se um aumento na eficiência da extração de aproximadamente 82 %. Sendo assim, o experimento 1 foi a melhor condição para extrair os três analitos através do método de extração por ultrassom.

O experimento 5 da Tabela 4.7, foi executado com as mesmas variáveis 1 e 2 do experimento 1, porém a variável 3 (tempo) foi diferente, sendo: 60 min para o experimento 5 e 15 min para o experimento 1. Assim, como ambos extraíram quantidades semelhantes dos flavonoides estudados, realizou-se a substituição do experimento 5 pelo experimento 1, a fim de obter um método de extração mais verde diminuindo o gasto energético.

Dessa forma, a melhor condição para extrair os três flavonoides pelo método de extração por ultrassom foi a realizada no experimento 1, que utilizou 0,05 de razão amostra/solvente, 30% proporção de etanol e o tempo de 15 minutos.

4.5.3. Perfil cromatográfico do extrato de maracujá azedo obtido por ultrassom

Dentre os experimentos realizados no método de extração por ultrassom, observou-se que os cromatogramas são muito semelhantes. Desta forma, o cromatograma do experimento 1, por razões discutidas anteriormente, foi o escolhido para representar o perfil dos analitos presentes na casca da maracujá azedo, conforme ilustrado na Figura 4.9. E ainda, na Figura 4.10 ilustra as absorções no UV-Vis obtidas no tempo de retenção demonstradas na Figura 4.9.

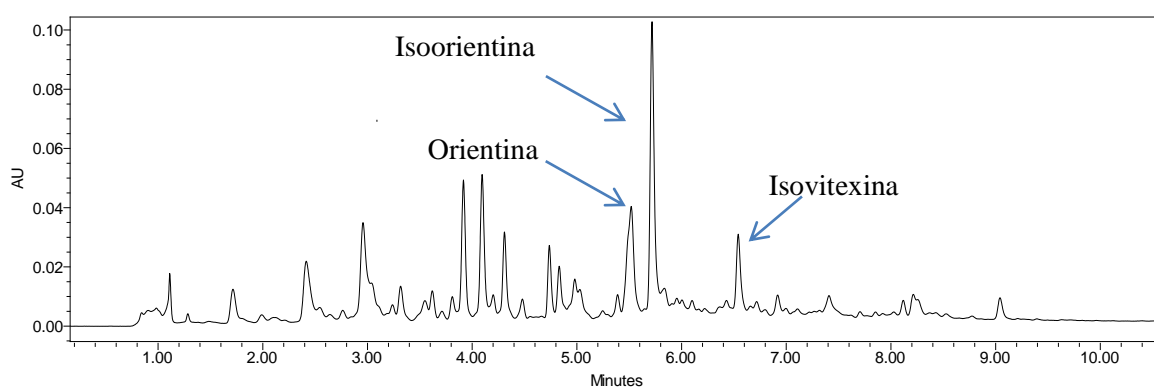
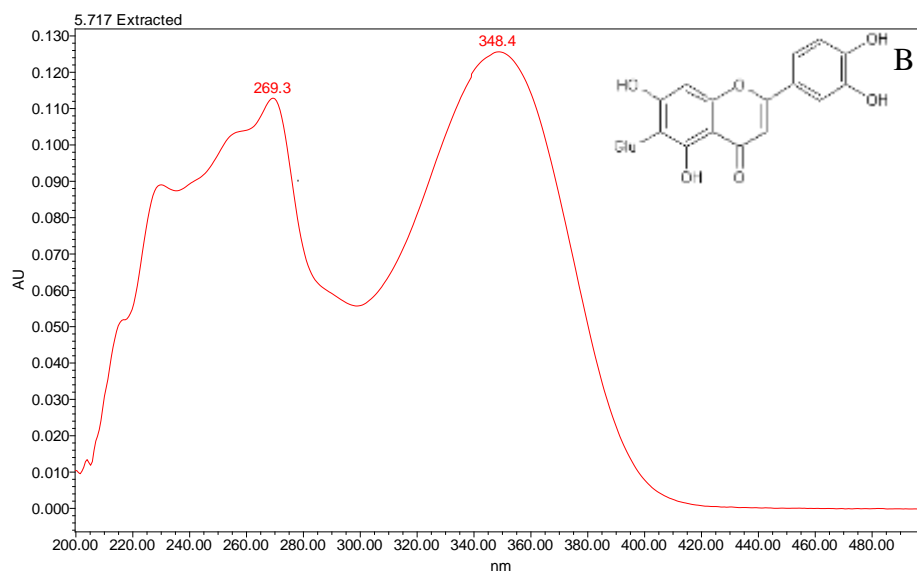
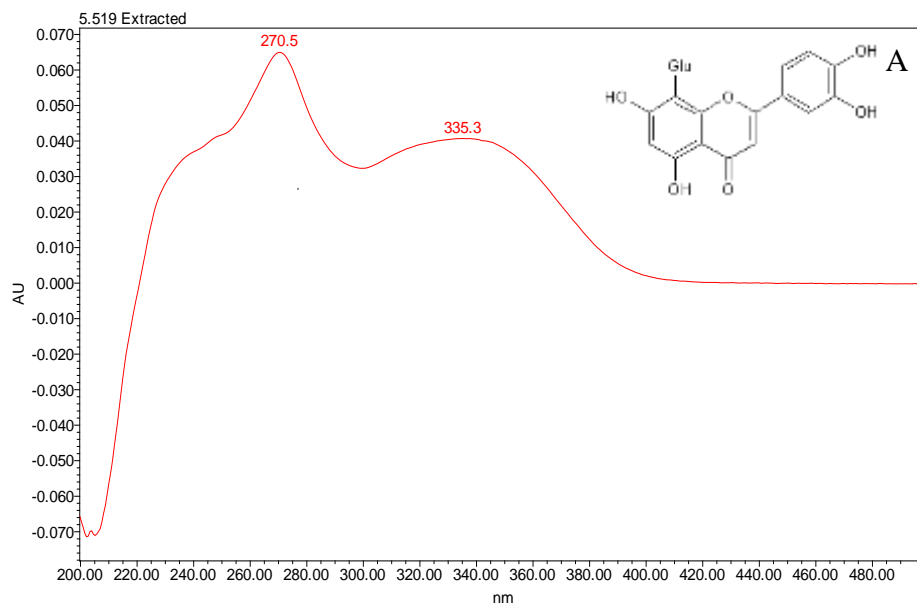
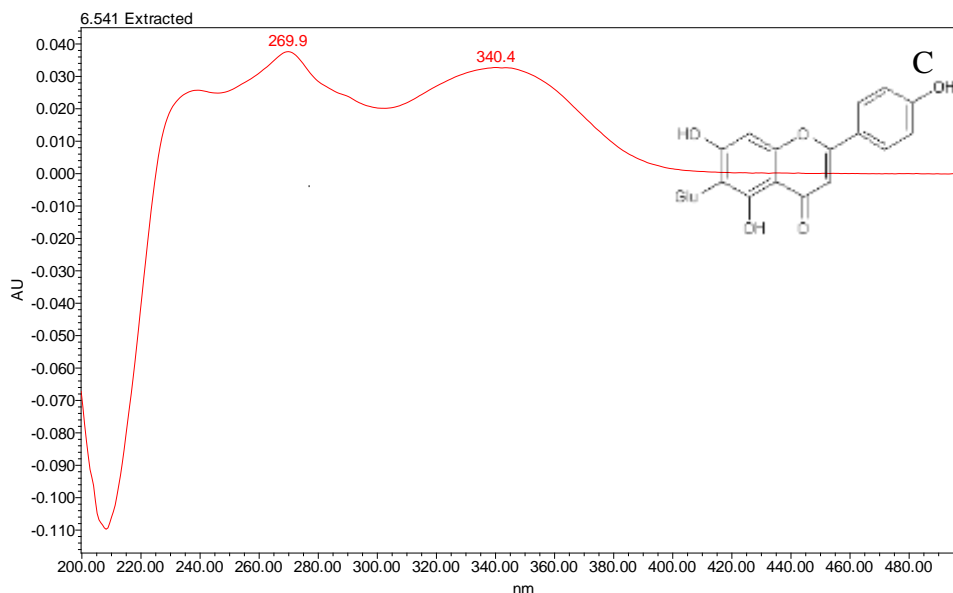


FIGURA 4.9 – Perfil cromatográfico do ultrassom (experimento 1) da casca maracujá azedo em $\lambda=330$ nm.

Observou-se na Figura 4.9 os analitos que foram identificados nas condições estudadas deste método de extração, bem como os tempos de retenção, sendo eles: 5.519 min (orientina), 5.717 min (isoorientina) e 6.541 min (isovitexina).

A Figura 4.10 mostra os espectros de absorção no UV-Vis no comprimento de onda em 330 nm do experimento 8 da extração por ultra-turrax, sendo orientina (A), isoorientina (B) e isovitexina (C).





*

FIGURA 4.10 – Espectros de absorção no UV em $\lambda=330$ nm do experimento ultrassom dos analitos orientina (A), isoorientina (B) e isovitexina (C) nos tempos de retenção correspondentes.

Baseado nos dados apresentados no item 4.1, e através das Figuras 4.9 e 4.10, pode-se concluir que as condições estudadas no método de extração por ultrassom também permitiram realizar a extração de orientina, isoorientina e isovitexina.

4.6.Extração por microondas

Semelhante aos tópicos anteriores, neste também serão apresentadas as extrações – por microondas – em 3 momentos: planejamento fatorial, influência das variáveis e perfil cromatográfico maracujá azedo no microondas.

4.6.1. Planejamento fatorial microondas

O planejamento fatorial para o método baseado no microondas foi realizado conforme descrito no item 3.8, e nos subitens 3.8.1 e 3.8.2. Neste caso, alteraram-se quatro variáveis, a saber: razão amostra/solvente, proporção de etanol, tempo e temperatura, em três níveis diferentes, nível alto (+1), ponto central (0) e nível baixo (-1), obtendo-se um planejamento do tipo 2^4 , composto por 16 experimentos. O experimento 17 foi realizado em triplicata. A Tabela 4.8 mostra os resultados deste planejamento após a extração.

TABELA 4.8 – Quantidade de compostos extraídos do microondas ($\text{mg.g}^{-1} \pm \text{DP}$)

Exp	Razão amostra/solvente	Proporção etanol	Tempo	Temperatura	Orientina	Isoorientina	Isovitexina
1	-1	-1	-1	-1	$0,52 \pm 0,03$	$0,70 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,01$
2	1	-1	-1	-1	$0,82 \pm 0,03$	$0,78 \pm 0,03$	$0,23 \pm 0,01$
3	-1	1	-1	-1	$0,74 \pm 0,03$	$0,74 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,01$
4	1	1	-1	-1	$0,52 \pm 0,03$	$0,67 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,01$
5	-1	-1	1	-1	$0,81 \pm 0,03$	$0,85 \pm 0,03$	$0,23 \pm 0,01$
6	1	-1	1	-1	$0,36 \pm 0,03$	$0,36 \pm 0,03$	$0,10 \pm 0,01$
7	-1	1	1	-1	$0,77 \pm 0,03$	$0,77 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,01$
8	1	1	1	-1	$0,57 \pm 0,03$	$0,70 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,01$
9	-1	-1	-1	1	$0,88 \pm 0,03$	$0,82 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,01$
10	1	-1	-1	1	$0,82 \pm 0,03$	$0,94 \pm 0,03$	$0,34 \pm 0,01$
11	-1	1	-1	1	$0,45 \pm 0,03$	$0,67 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,01$
12	1	1	-1	1	$0,70 \pm 0,03$	$0,79 \pm 0,03$	$0,26 \pm 0,01$
13	-1	-1	1	1	$0,57 \pm 0,03$	$0,67 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,01$
14	1	-1	1	1	$0,47 \pm 0,03$	$0,64 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,01$
15	-1	1	1	1	$0,42 \pm 0,03$	$0,60 \pm 0,03$	$0,18 \pm 0,01$
16	1	1	1	1	$0,64 \pm 0,03$	$0,70 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,01$
17*	0	0	0	0	$0,89 \pm 0,03$	$0,93 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,01$

*Experimento realizado em triplicata

Observa-se na Tabela 4.8 a quantidade extraída dos flavonoides desse método. A quantidade encontrada foi calculada por meio das equações de reta apresentada no item 4.2, seguida de uma conversão para mg.g^{-1} . Através dos valores das triplicata calculou-se o desvio padrão, obtendo-se o erro para a extração de cada flavonoide.

4.6.2. Influência das variáveis

Para avaliar a influência das variáveis, multiplicou-se as respostas obtidas, pelos valores codificados do planejamento fatorial, conforme a Tabela 4.8, em seguida somou-os, obtendo os valores de efeito. Após este tratamento de dados, avaliou-se as interações principais, sendo 1, 2, 3 e 4, e as interações secundárias 12, 13, 14, 23, 24 e 34, ou seja, 1 representa a variável razão amostra solvente, e 2, 3 e 4 as variáveis proporção de etanol, tempo e temperatura, respectivamente.

A Tabela 4.9 ilustra os valores obtidos do cálculo de efeito, bem como a porcentagem de influência das variáveis e interações para os flavonoides isoorientina, isovitexina e orientina. Através destes cálculos, as Figuras 4.11 e 4.12, ilustram qual a influência das variáveis estudadas no método de extração por microondas.

TABELA 4.9 – Influência das variáveis: 1, razão amostra/solvente; 2, proporção de etanol, 3, tempo e 4, temperatura, no microondas

		Orientina			Isoorientina			Isovitexina		
Efeito	Variáveis	Efeito (E)	(E) ²	Influência (%)	Efeito (E)	(E) ²	Influência (%)	Efeito (E)	(E) ²	Influência (%)
Primário	1	- 0,23	0,06	1,53	- 0,22	0,05	1,57	0,07	0,00	0,85
	2	- 0,44	0,19	5,31	- 0,13	0,02	0,55	- 0,14	0,02	3,42
	3	- 0,84	0,71	19,78	- 0,83	0,69	22,30	- 0,25	0,06	10,90
	4	- 0,16	0,02	0,67	0,27	0,07	2,36	0,38	0,14	26,10
Secundário	12	0,35	0,12	3,37	0,41	0,17	5,45	0,17	0,03	5,09
	13	- 0,81	0,65	18,08	- 0,74	0,55	17,80	- 0,25	0,06	11,60
	14	0,88	0,77	21,49	0,87	0,76	24,50	0,28	0,08	14,20
	23	0,83	0,69	19,05	0,62	0,38	12,50	0,25	0,06	10,90
	24	- 0,62	0,39	10,72	- 0,49	0,24	7,78	- 0,27	0,07	13,10
	34	- 0,66	0,44	12,16	- 0,40	0,16	5,19	- 0,15	0,02	3,83
		Soma	3,60		Soma	3,08		Soma	0,55	

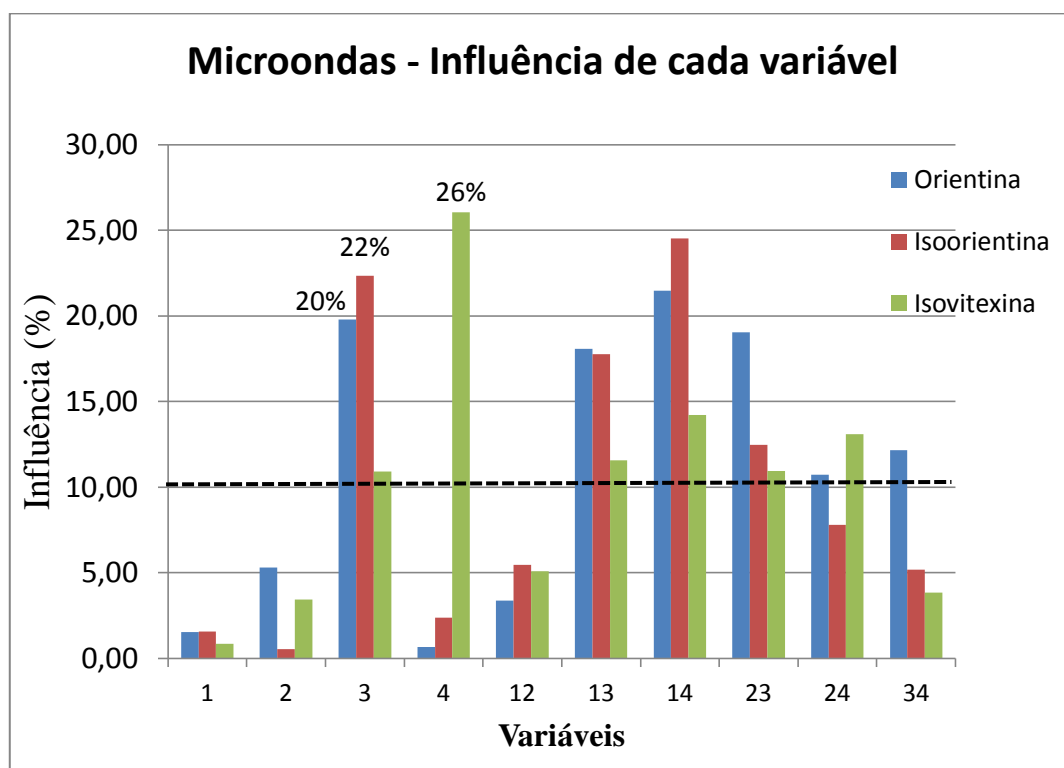


FIGURA 4.11 – Porcentagem da influência das variáveis para o microondas

Os valores de porcentagem de influência destacados na Tabela 4.9 resume os dados apresentados na Figura 4.11. Quando a influência é abaixo de 10%, considera-se que não possui um efeito significativo no sistema. Desta forma, as variáveis 3 e 4, tempo e temperatura, demonstraram uma maior influência na extração dos flavonoides, de forma que a variável 3 a mais significativa para a isoorientina e para a orientina, e a variável 4

para a isovitexina, sendo este conjunto de variáveis responsáveis por aproximadamente 70% dos efeitos mais significativos para obter a melhor condição de extração.

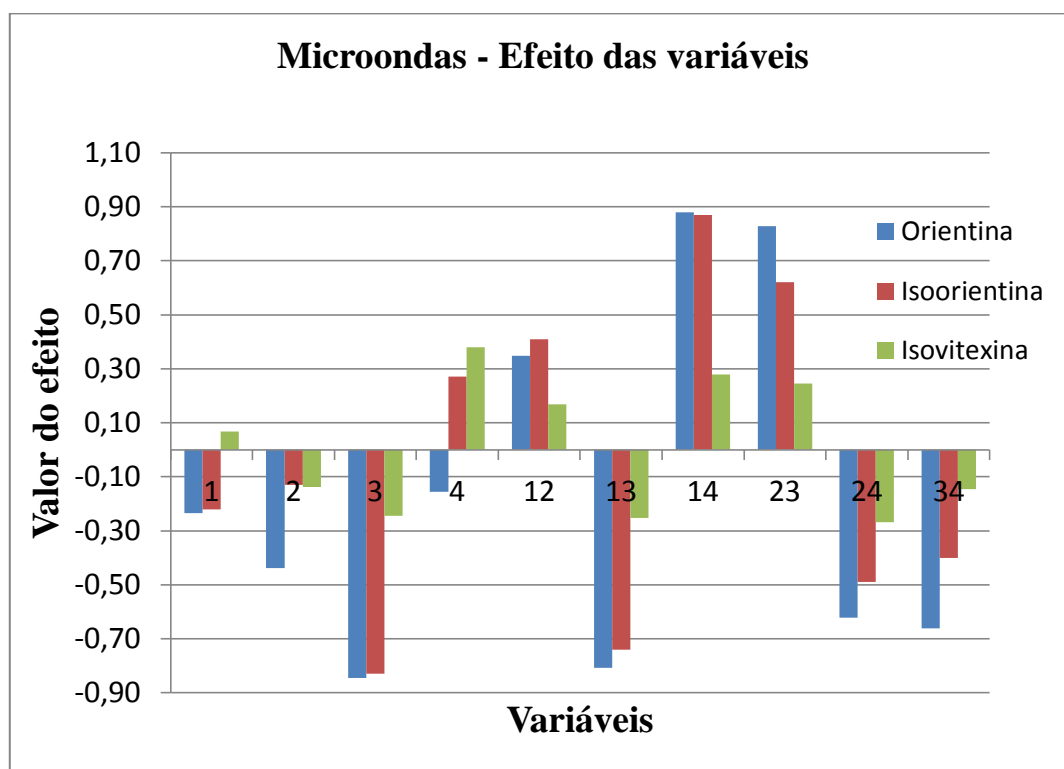


FIGURA 4.12 – Efeito positivo e negativo das variáveis para o microondas

A Figura 4.12 ilustra os valores de efeito que são positivos ou negativos, ou seja, para a variável 3 os valores de efeitos - para ambos os flavonoides são negativos, e para a variável 4 positivo, ou seja, quanto menor o tempo e maior a temperatura no método de extração do microondas, maior será a quantidade extraída dos flavonoides estudados. Desta forma, a Tabela 4.10 destaca os experimentos que obtiveram uma maior e menor eficiência de extração dos três analitos.

TABELA 4.10 – Melhores condições para a extração do microondas (mg.g ± DP)

Exp	Razão amostra/solvente	Proporção etanol (%)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Orientina	Isoorientina	Isovitexina
1	0,05	30 EtOH	5	60	0,52 ± 0,03	0,70 ± 0,03	0,19 ± 0,01
2	0,1	30 EtOH	5	60	0,82 ± 0,03	0,78 ± 0,03	0,23 ± 0,01
3	0,05	70 EtOH	5	60	0,74 ± 0,03	0,74 ± 0,03	0,20 ± 0,01
4	0,1	70 EtOH	5	60	0,52 ± 0,03	0,67 ± 0,03	0,19 ± 0,01
5	0,05	30 EtOH	25	60	0,81 ± 0,03	0,85 ± 0,03	0,23 ± 0,01
6	0,1	30 EtOH	25	60	0,36 ± 0,03	0,36 ± 0,03	0,10 ± 0,01
7	0,05	70 EtOH	25	60	0,77 ± 0,03	0,77 ± 0,03	0,22 ± 0,01
8	0,1	70 EtOH	25	60	0,57 ± 0,03	0,70 ± 0,03	0,21 ± 0,01

9	0,05	30 EtOH	5	120	0,88 ± 0,03	0,82 ± 0,03	0,28 ± 0,01
10	0,1	30 EtOH	5	120	0,82 ± 0,03	0,94 ± 0,03	0,34 ± 0,01
11	0,05	70 EtOH	5	120	0,45 ± 0,03	0,67 ± 0,03	0,20 ± 0,01
12	0,1	70 EtOH	5	120	0,70 ± 0,03	0,79 ± 0,03	0,26 ± 0,01
13	0,05	30 EtOH	25	120	0,57 ± 0,03	0,67 ± 0,03	0,24 ± 0,01
14	0,1	30 EtOH	25	120	0,47 ± 0,03	0,64 ± 0,03	0,22 ± 0,01
15	0,05	70 EtOH	25	120	0,42 ± 0,03	0,60 ± 0,03	0,18 ± 0,01
16	0,1	70 EtOH	25	120	0,64 ± 0,03	0,70 ± 0,03	0,25 ± 0,01
17*	0,07	40 EtOH	15	90	0,89 ± 0,03	0,93 ± 0,03	0,30 ± 0,01

*Experimento realizado em triplicata

Os experimentos 6 e 10 destacados na Tabela 4.10 são aqueles que menos e mais extraíram os três analitos, respectivamente. Conforme discutido anteriormente, aplicou-se no experimento 6 a variável 3 (tempo) e a variável 4 (temperatura), nos níveis alto e baixo do planejamento fatorial, extraíndo apenas $0,36 \pm 0,030$, $0,36 \pm 0,033$, $0,10 \pm 0,010$ mg.g⁻¹ dos flavonoides orientina, isorientina e isovitexina, respectivamente. Já o experimento 10 é o melhor experimento para extrair os três flavonoides, sendo a variável 3 (tempo) com 5 min e a variável 4 (temperatura), com 120°C, extraíndo $0,82 \pm 0,030$, $0,94 \pm 0,033$ e $0,34 \pm 0,010$ e mg.g⁻¹ dos flavonoides orientina, isorientina e isovitexina. Ao comparar os valores máximo e mínimo da eficiência de extração nos experimentos 6 e 10 tem-se que a mudança do tempo e temperatura aumentou a extração de aproximadamente 71%, 62% e 56% e para a orientina, isorientina e isovitexina, respectivamente.

Desta forma, a melhor condição para extrair os 3 flavonoides no método de extração por microondas foi a realizada no experimento 10, que compreende 0,10 de razão amostra/solvente, 30% proporção de etanol, 5 min tempo e 120°C temperatura.

4.6.3. Perfil cromatográfico do extrato de maracujá azedo obtido por microondas

Dentre os experimentos realizados no método de extração por microondas, observou-se que os cromatogramas são muito semelhantes. Desta forma, o cromatograma do experimento 10, por razões discutidas anteriormente, foi o escolhido para representar o perfil dos analitos presentes na casca do maracujá azedo, conforme ilustrado na Figura 4.13. E ainda, na Figura 4.14 são ilustradas as absorções no UV-Vis obtidas no tempo de retenção demonstradas na Figura 4.13.

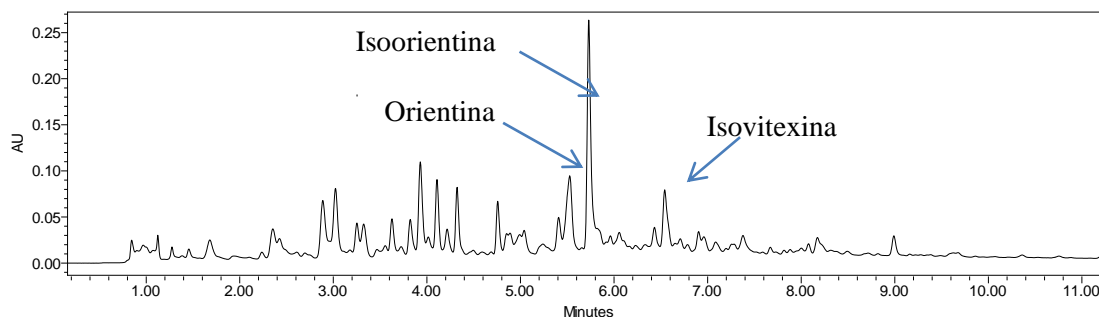
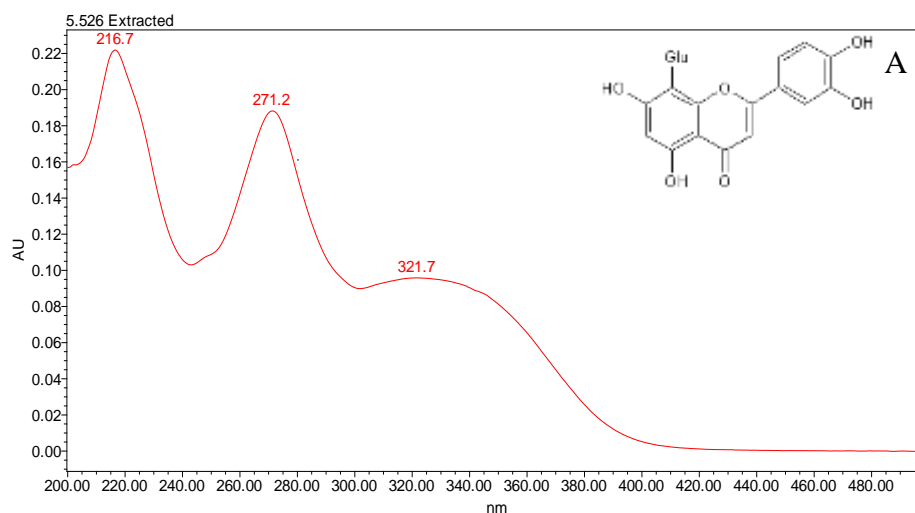


FIGURA 4.13 – Perfil cromatográfico do microondas (experimento 10) da casca do maracujá azedo em $\lambda=330$ nm.

Observou-se na Figura 4.13 os analitos que foram identificados nas condições estudadas deste método de extração, bem como os tempos de retenção, sendo, 5.526 min (orientina), 5.730 min (isoorientina), 6.541 min (isovitexina).

A Figura 4.14 mostra os espectros de absorção no UV-Vis no comprimento de onda em 330 nm do experimento 8 da extração por ultra-turrax, sendo orientina (A), isoorientina (B) e isovitexina (C).



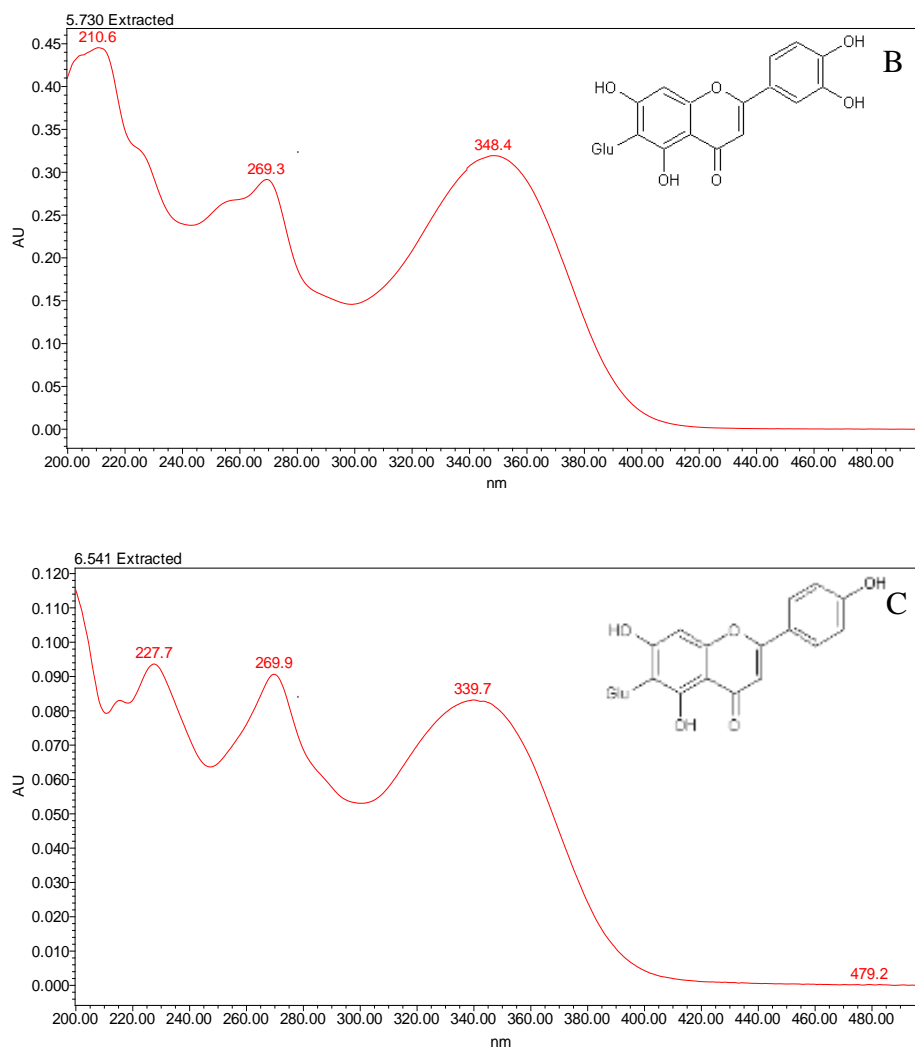


FIGURA 4.14 – Espectros de absorção no UV em $\lambda=330$ nm do experimento 10 do microondas dos analitos orientina (A), isoorientina (B) e isovitexina (C) nos tempos de retenção correspondentes.

Baseado nos dados apresentados no item 4.1, e através das Figuras 4.13 e 4.14, pode-se concluir que as condições estudadas no método de extração por micro-ondas também possibilitam a extração de 3 analitos: orientina, isoorientina e isovitexina.

4.7. Cálculo da eficiência de extração e do gasto energético

Para o cálculo da eficiência de extração, de acordo com os dados apresentados no item 4.6, reuniu-se na Tabela 4.11 os maiores valores obtidos na extração dos flavonoides orientina, isoorientina, isovitexina. Assim, para o método de extração ultra-turrax considerou-se o experimento 8, já para o ultrassom considerou-se o experimento 1 e para o microondas o experimento 10.

TABELA 4.11 – Eficiência de extração dos flavonoides isoorientina, isovitexina e orientina dos melhores experimentos dos métodos estudados ($\text{mg.g}^{-1} \pm \text{DP}$)

Flavonoides	Ultra-turrax (exp.8)	Ultrassom (exp.1)	Microondas (exp.10)
Orientina	0,94	0,70	0,82
Isoorientina	1,11	0,69	0,94
Isovitexina	0,34	0,17	0,34
Orientina + Isoorientina + Isovitexina	2,39	1,56	2,10

Na Tabela 4.11 realizou-se a soma das quantidades extraídas dos três flavonoides nos três métodos de extração. Assim, o ultra-turrax foi o método que mais extraiu flavonoides com $2,39 \text{ mg.g}^{-1}$, enquanto que o ultrassom e o microondas extraíram $1,56$ e $2,10$ em mg.g^{-1} , respectivamente.

Em contrapartida para o cálculo do gasto energético, diante da necessidade de substituir a energia não renovável (petróleo), por energias renováveis ou mesmo economizar seu uso, teve-se a necessidade de otimização dos gastos energéticos. Então, realizou-se o cálculo do gasto energético para extrair os flavonoides da casca do maracujá nas condições em que os métodos mostraram a maior recuperação dos flavonoides, como mostra a Tabela 4.12.

TABELA 4.12 – Cálculo do gasto energético dos métodos de extração estudados

Melhor extração (min.)	Método extração	Conversão hora (h)	Potência equipamento (W)	Energia elétrica consumida (W.h)
5	Microondas	0,083	800	66,4
8	Ultra-turrax	0,13	125	16,3
15	Ultrassom	0,25	100	25,0

Como observado na Tabela 4.12 o ultra-turrax é o método de extração que menos consumiu energia elétrica (com $16,3 \text{ W.h}$), e também o método que mais extraiu os flavonoides conforme mostrado na Tabela 4.11. Apesar de utilizar 3 minutos a mais do que o microondas, que possui o menor tempo de extração, a diferença de energia elétrica consumida entre eles é de aproximadamente 4x maior, fazendo então o ultra-turrax ser o método de extração que consome menos energia e extrai mais os analitos em estudo.

4.8. Avaliação do grau verde dos métodos de extração pela métrica da Estrela Verde

Conforme apresentado anteriormente (ver itens 1.5.5 e 3.10), a métrica holística da EV permite uma análise visual prévia do método de extração, em relação ao cumprimento dos princípios da QV. Assim, aplicou-se uma pontuação entre 1 - 3 para o

preenchimento da métrica, sendo 3 quando o princípio é cumprido, tornando-o método de extração mais verde. Todavia preenchendo a EV o 2 é uma pontuação intermediária, e o 1 significa que o método não cumpre determinado princípio tornando-o menos verde, não preenchendo a EV.

Realizou-se um levantamento dos solventes e resíduos gerados para os três métodos de extração, no qual considerando como solvente, a solução hidroetanólica, e como resíduo, a casca do maracujá azedo após a extração. Tanto um como outro não apresentam perigo (inócuos). Assim, construiu-se a Tabela 4.13.

TABELA 4.13 – Pontuação da EV para os métodos de extração ultra-turrax, ultrassom e microondas

Princípios da Química Verde	Pontuação (p)	Critérios	Ultra-turrax	Ultrassom	Microondas	Justificativa
P1 – Prevenção	3	Todos os resíduos são inócuos (p = 1, Tabela 3.7).	3	3	3	Todos os resíduos são inócuos
	2	Formação de pelo menos um resíduo que envolva perigo moderado para a saúde e ambiente (p = 2, Tabela 3.7, sem nenhum que envolva p = 3).				
	1	Formação de pelo menos um resíduo que envolva perigo elevado para a saúde e ambiente (p = 3, Tabela 3.7).				
P2 - Economia de átomos	3	Reações sem reagentes em excesso ($\leq 10\%$) e sem formação de coprodutos.	3	3	3	Sem reagentes em excesso e sem formação de coprodutos
	2	Reações sem reagentes em excesso ($\leq 10\%$) e com formação de coprodutos.				
	2	Reações com reagentes em excesso ($> 10\%$) e sem formação de coprodutos.				
	1	Reações com reagentes em excesso ($> 10\%$) e com formação de coprodutos.				
P3 – Sínteses com compostos de menor toxicidade	3	Todas as substâncias envolvidas são inócuas (p = 1, Tabela 3.7). As substâncias envolvidas apresentam perigo moderado para a saúde e ambiente (p = 2, Tabela 1, pelo menos para uma substância, sem substâncias com p = 3). Pelo menos uma das substâncias envolvidas apresenta perigo elevado para a saúde e ambiente (p = 3, Tabela 3.7).	3	3	3	Todos os reagentes são inócuos
	2	Todas as substâncias envolvidas são inócuas (p = 1, Tabela 3.7). As substâncias envolvidas apresentam perigo moderado para a saúde e ambiente (p = 2, Tabela 1, pelo menos para uma substância, sem substâncias com p = 3). Pelo menos uma das substâncias envolvidas apresenta perigo elevado para a saúde e ambiente (p = 3, Tabela 3.7).				
	1	Todas as substâncias envolvidas são inócuas (p = 1, Tabela 3.7). As substâncias envolvidas apresentam perigo moderado para a saúde e ambiente (p = 2, Tabela 1, pelo menos para uma substância, sem substâncias com p = 3). Pelo menos uma das substâncias envolvidas apresenta perigo elevado para a saúde e ambiente (p = 3, Tabela 3.7).				

P5 – Diminuição de solventes e auxiliares	3	Os solventes e as substâncias auxiliares não existem ou são inócuas (p = 1, Tabela 3.7).	3	3	3	Os solventes água e etanol são inócuos
	2	Os solventes e as substâncias auxiliares usadas envolvem perigo moderado para a saúde e ambiente (p = 2, Tabela 3.7, pelo menos para uma substância, sem substâncias com p = 3).				
	1	Pelo menos um dos solventes ou uma das substâncias auxiliares usadas envolve perigo elevado para a saúde e ambiente (p = 3, Tabela 3.7).				
P6 – Busca pela eficiência energética	3	Temperatura e pressão ambientais.	3	3	1	As extrações por ultra-turrax e ultrassom foram realizadas em temperatura ambiente, porém o ultrassom é um técnica que consome mais energia do que o ultra-turrax. Já na extração por microondas foi utilizada temperatura e pressão diferentes da ambiental, e percebeu-se que consome mais energia do que os demais métodos
	2	Pressão ambiental e temperatura entre 0 °C e 100 °C que implique arrefecimento ou aquecimento.				
	1	Pressão diferente da ambiental e/ou temperatura > 100 °C ou menor do que 0 °C.				
P7 – Uso de fontes renováveis	3	Todos os reagentes/matérias-primas envolvidos são renováveis (p = 1, Tabela 3.8).	3	3	3	A casca de maracujá e o etanol são renováveis
	2	Pelo menos um dos reagentes/matérias-primas envolvidos é renovável, não se considera a água (p = 1, Tabela 3.8).				
	1	Nenhum dos reagentes/matérias-primas envolvidos é renovável, não se considera a água (p = 3, Tabela 3.8).				
P8 – Reduzir a formação de derivados	3	Sem derivatizações ou com uma etapa.	3	3	3	Não possui derivatizações
	2	Usa-se apenas uma derivatização ou duas etapas.				
	1	Usam-se várias derivatizações ou mais do que duas etapas				

P9 – Catálise	3	Não usam-se catalisadores ou os catalisadores são inócuos (p = 1, Tabela 3.7)	3	3	3	Não possui catalisadores
	2	Utilizam-se catalisadores que envolvem perigo moderado para a saúde e ambiente (p = 2, Tabela 3.7)				
	1	Utilizam catalisadores que envolvem perigo elevado para a saúde e ambiente (p = 3, Tabela 3.7)				
P10 – Desenvolvimento de compostos para a degradação	3	Todas as substâncias envolvidas são degradáveis com os produtos de degradação inócuos (p = 1, Tabela 3.8).	3	3	3	A casca do maracujá e o etanol são degradáveis com produtos de degradação inócuos
	2	Todas as substâncias envolvidas que não são degradáveis podem ser tratados para obter a sua degradação com os produtos de degradação inócuos (p = 2, Tabela 3.8).				
	1	Pelo menos uma das substâncias envolvidas não é degradável nem pode ser tratada para obter a sua degradação com produtos de degradação inócuos (p = 3, Tabela 3.8).				
P12 – Química segura para a prevenção de acidentes	3	As substâncias envolvidas apresentam perigo baixo de acidente químico (p = 1, Tabela 3.7, considerando os perigos para a saúde e perigos físicos).	1	1	1	De acordo com a ficha de segurança do etanol, ele apresenta perigo físico.
	2	As substâncias envolvidas apresentam perigo moderado de acidente químico (p = 2, Tabela 3.7, pelo menos para uma substância, considerando os perigos para a saúde e perigos físicos, e sem substâncias com p = 3).				
	1	As substâncias envolvidas apresentam perigo elevado de acidente químico (p = 3, Tabela 3.7, considerando os perigos para a saúde e perigos físicos).				

A partir da pontuação descrita na Tabela 4.13, plotou-se Figura 4.15 que representa a métrica EV para os três métodos de extração. Posteriormente, calculou-se o grau verde, o qual representa o quanto a EV está preenchida, segundo RIBEIRO et al. (2010) é mostrado pelo Índice de Preenchimento da Estrela (IPE), o qual chamamos de grau verde.

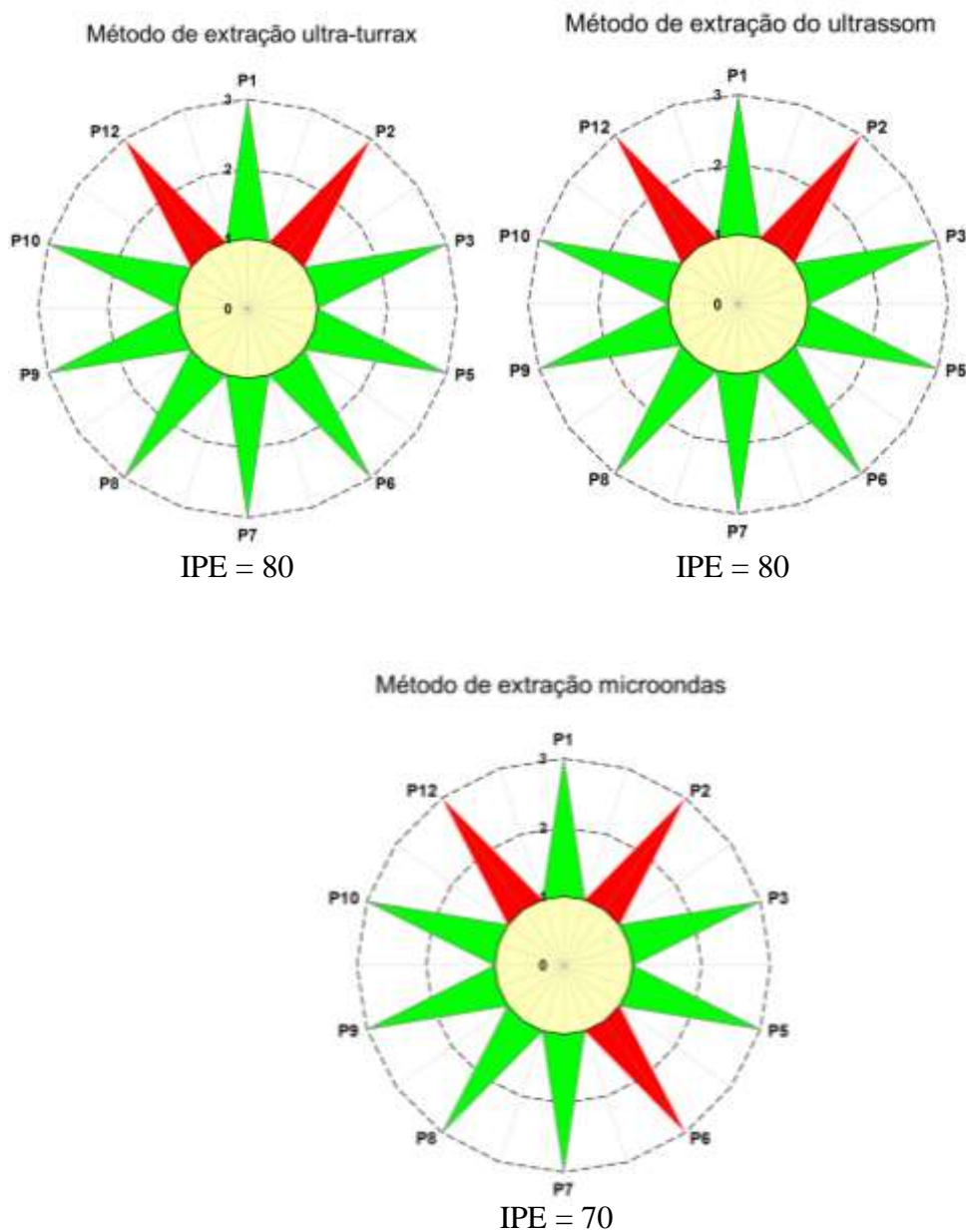


FIGURA 4.15 – EV dos métodos de extração ultra-turrax, ultrassom e microondas

Observa-se na Figura 4.15 que ambos os métodos de extração obtiveram um perfil semelhante, em relação a pontuação do princípio 2 (economia de átomos) e 12, (química segura para a prevenção de acidentes), que obteve uma pontuação equivalente a 1, pois o etanol é inflamável. Entretanto, a extração por microondas também obteve a mesma pontuação para o princípio 6 (busca pela eficiência energética), porque a extração não foi realizada em temperatura ambiente, implicando assim na diminuição do grau verde.

A análise do grau verde pode dar através da análise visual, ou seja, onde a estrela contempla mais a coloração verde, ou pelo IPE. Pela análise visual observa-se que o ultra-turrax e o ultrassom apresentam um preenchimento maior do que o microondas, ou seja,

o microondas é o experimento menos verde. Assim, ao avaliar também o grau verde pelo IPE tem-se que o ultra-turrax e ultrassom apresentaram um IPE equivalente a 80 e o microondas equivalente a 70. Desta forma, a extração por microondas é o método de extração menos verde, e ainda, haveria um “empate” entre ultra-turrax e ultrassom, mas conforme os dados apresentados anteriormente, o ultra-turrax apresentou um melhor desempenho na extração dos flavonoides isoorientina, isovitexina e orientina. E também no cálculo do gasto energético dos melhores experimentos dos métodos de extração, o ultra-turrax demonstrou o menor gasto energético.

Diante dessa discussão, conclui-se que o método de extração realizado por ultra-turrax possui um maior grau verde, sendo uma técnica mais sustentável, atingindo com mais amplitude os 12 Princípios da QV.

4.9. Validação do método analítico

Com base nos resultados apresentados nos itens anteriores, tem-se que o experimento 8 da extração por ultra-turrax foi o melhor método de extração para orientina, isoorientina e isovitexina, quando comparado aos outros métodos de extração estudados (ultrassom e microondas). Desta forma, o extrato obtido através das condições aplicadas a este experimento foi definido como aquele a ser utilizado para a avaliação dos parâmetros da validação do método analítico como especificidade, linearidade, recuperação, precisão, limite de detecção e quantificação (RIBANI, et al., 2004, ZERAIK, 2010). E antes de iniciar a avaliação dos parâmetros otimizou-se o método cromatográfico, conforme mostrado a seguir.

4.9.1. Otimização do método cromatográfico

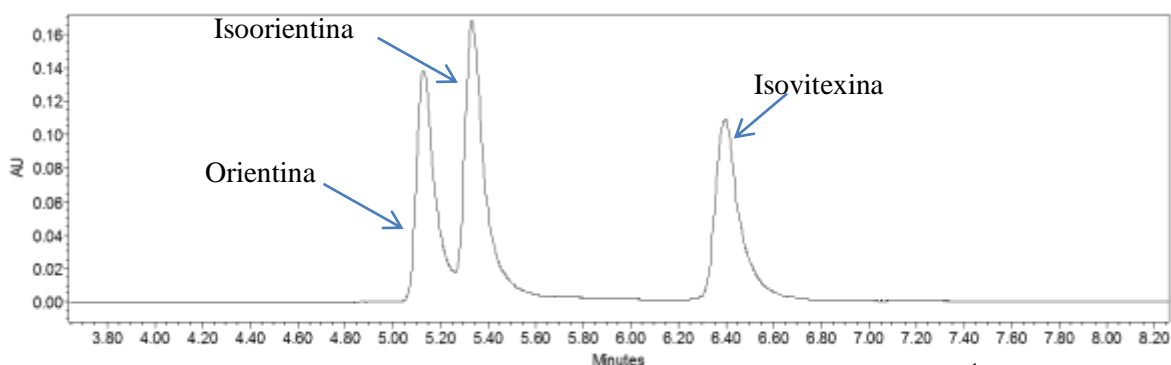
Conforme descrito no item 3.4, a fase móvel e a estacionária, vazão, volume de injeção e a temperatura do forno, continuaram as mesmas. Porém, o tempo de análise, a proporção da fase móvel, e entre outros parâmetros foram alterados para obter uma melhor separação cromatográfica. Tais modificações podem ser observadas na Tabela 4.14 e nas Figuras 4.16 e 4.17.

TABELA 4.14 - Método cromatográfico de UPLC - PDA otimizado para a validação do experimento 8 ultra-turrax.

Tempo (min.)	% A	% B
0	90	10
3	80	20
7	76	24
9	0	100
11	0	100
12	90	10
14	90	10

De acordo com a Tabela 4.14, a fase móvel que corresponde a %A e %B são água ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico e ACN, respectivamente. Desta forma, ao comparar os métodos cromatográficos descritos na Tabela 4.14 e na Tabela 4.1, observou-se que o tempo de análise e a proporção da fase móvel foram alterados. Na Tabela 4.1, tinha 23 min de análise cromatográfica, iniciando com o solvente orgânico (ACN) em 10%, e obtendo uma variação de 3,2% de ACN por minuto. Já na Tabela 4.14, reduziu-se o tempo de análise para 9 min, e para melhorar a separação cromatográfica, variou-se de maneira mais branda o gradiente de solvente orgânico (% de ACN por minuto), a fim de obter melhor retenção dos analitos. Sendo assim, variou-se a proporção em 10% de ACN entre o tempo de 0 - 3 min, o que equivale a 3,33% de ACN por minuto; e de 3 - 7 min variou-se 1%, e de 7 - 9 min atingiu-se 100% de solvente orgânico para retirada de posterior impurezas, tendo em vista que os analitos de interesse não possuem o tempo de retenção nesta faixa.

E ainda, ao observar a varredura de 200 - 500 nm por meio do detector de PDA, observou-se que orientina, isoorientina e isovitexina, tiveram uma absorção maior em 350 nm do que em 330 nm. Diante do novo método cromatográfico desenvolvido, obteve-se o perfil do extrato obtido do experimento 8 do ultra-turrax, conforme ilustrados pelas Figuras 4.16 e 4.17.

FIGURA 4.16 – Perfil cromatográfico dos padrões na concentração de 100 mg.L⁻¹ dos flavonoides estudados no método otimizado para a validação do método analítico em $\lambda=350$ nm.

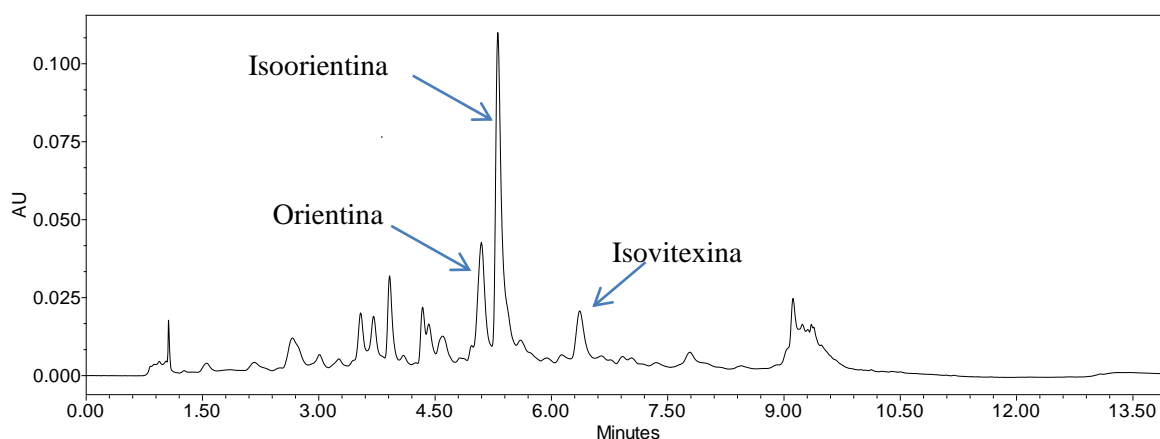
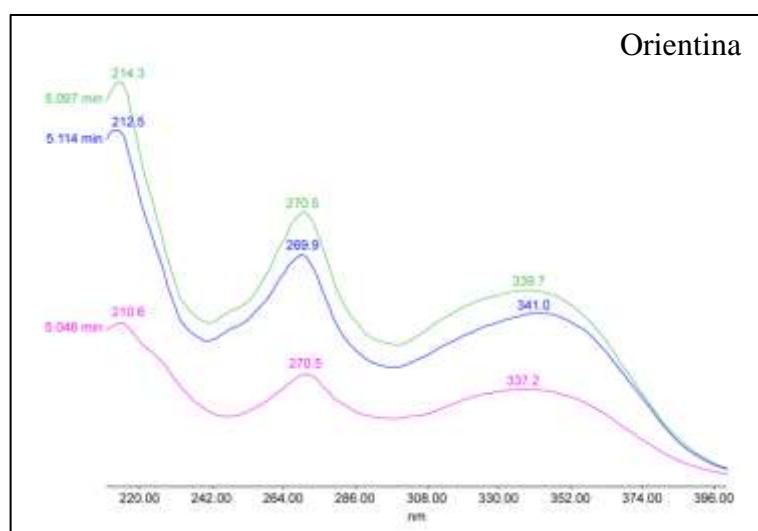


FIGURA 4.17 – Perfil cromatográfico do experimento 8 ultra-turrax no método otimizado para a validação do método analítico em $\lambda=350$ nm.

Observou-se no cromatograma da Figura 4.16, que o tempo de retenção dos padrões orientina, isoorientina e isovitexina são: 5.130, 5.335, 6.397 min, respectivamente. De forma análoga, observou-se no cromatograma da Figura 4.17 que os tempos de retenção são: 5.097, 5.309 e 6.366 min, respectivamente.

4.9.2. Especificidade

Para avaliar a pureza, obtida através do detector de PDA na varredura de 200-500 nm, das bandas cromatográficas dos analitos em estudo no extrato, selecionou-se o $\lambda=350$ nm. Após esta seleção, extraiu-se dos espectros de UV-Vis três tempos de retenção diferentes para cada analito, sobrepondo-os. A Figura 4.18 ilustra esta sobreposição.



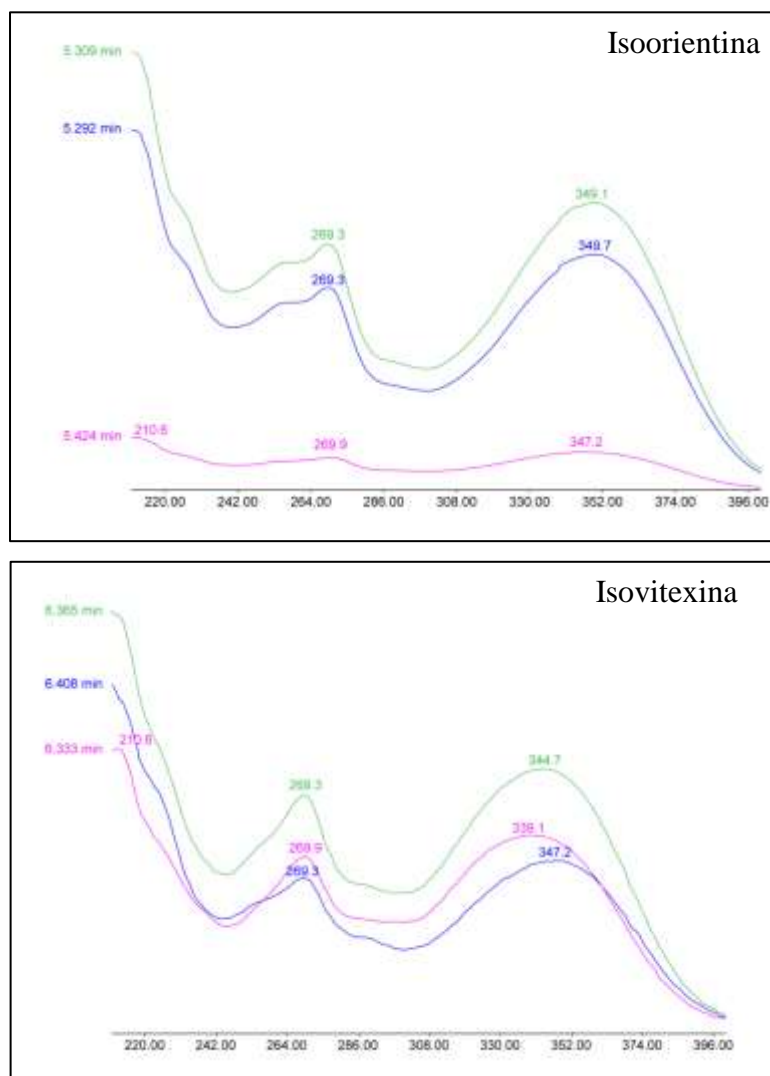


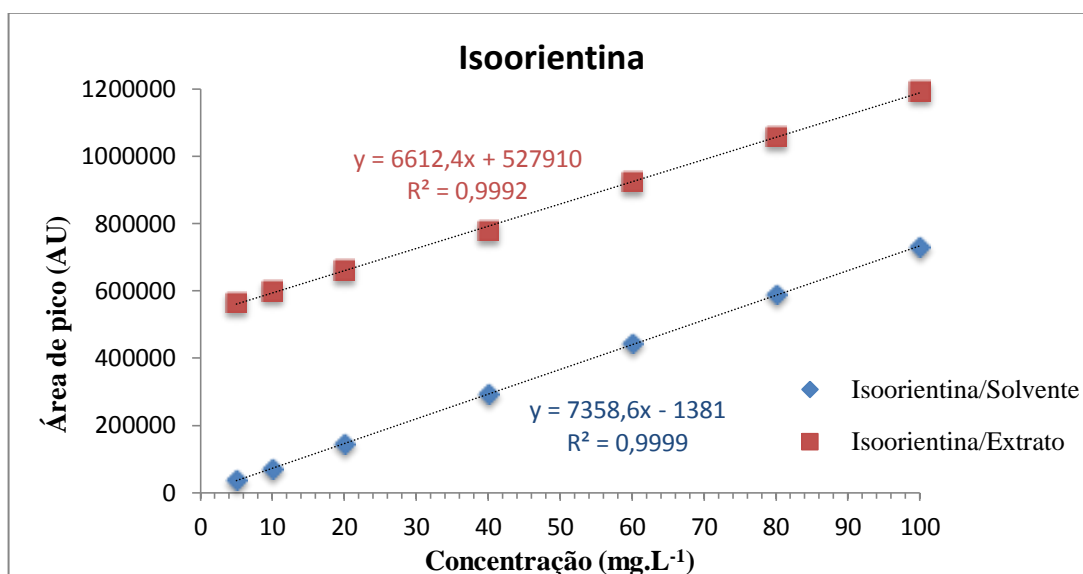
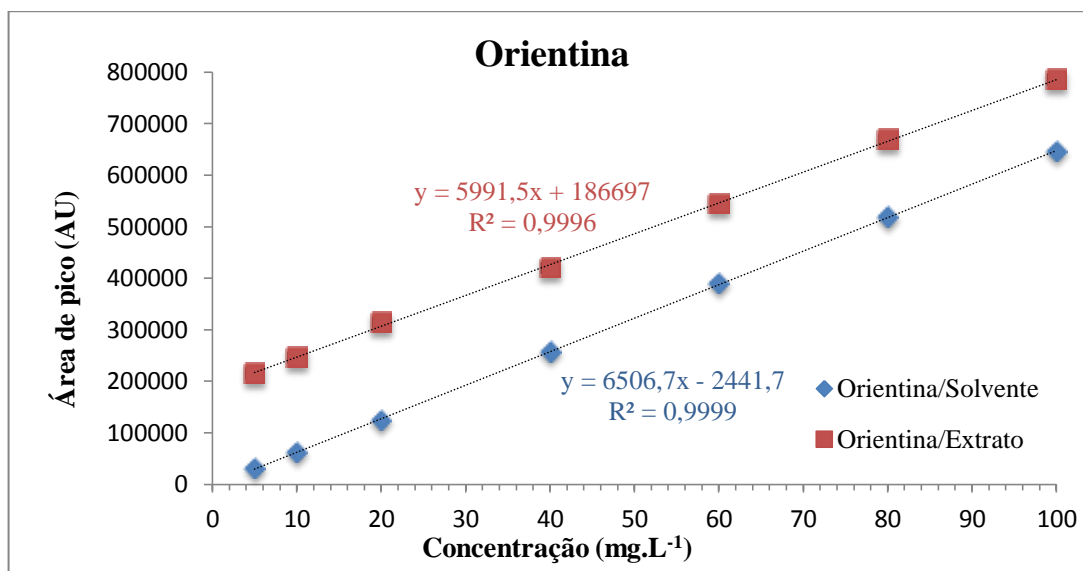
FIGURA 4.18 – Sobreposição do espectro de UV-Vis para avaliar a pureza dos analitos orientina, isoorientina e isovitexina.

Conforme apresentado na Figura 4.18, os tempos de retenção utilizados para sobrepor os espectros de UV-Vis da orientina foram: 5.097, 5.114 e 5.048 min. De forma análoga, para a isoorientina utilizou-se os tempos 5.309, 5.292 e 5.424 min e isovitexina, 6.365, 6.408 e 6.333 min, de modo que pode-se observar também que as absorções apresentaram similaridade entre si, ou seja, não há compostos co-eluidos junto com o analito de interesse, no caso, orientina.

4.9.3. Linearidade

Para avaliar o efeito de matriz no que tange a linearidade e, posteriormente, a recuperação construiu-se duas curvas analíticas, uma no solvente e outra no extrato para cada analito. Todas as análises foram realizadas em triplicata, e devido a complexidade da amostra utilizou-se o método de adição de padrão para ambas.

Desta forma, os pontos selecionados para ambas as curvas foram 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg.L⁻¹. Para preparar a curva no solvente utilizou-se solução estoque em metanol 100% que continha os três analitos em estudo, orientina, isorientina e isovitexina. Já para a curva no extrato utilizou-se como solvente o próprio extrato (experimento 8) para diluir os padrões orientina, isorientina e isovitexina, obtendo-se uma nova solução mistura, e preparando-se assim os pontos da curva. A Figura 4.19, como consta abaixo, ilustra o resultado do procedimento descrito anteriormente.



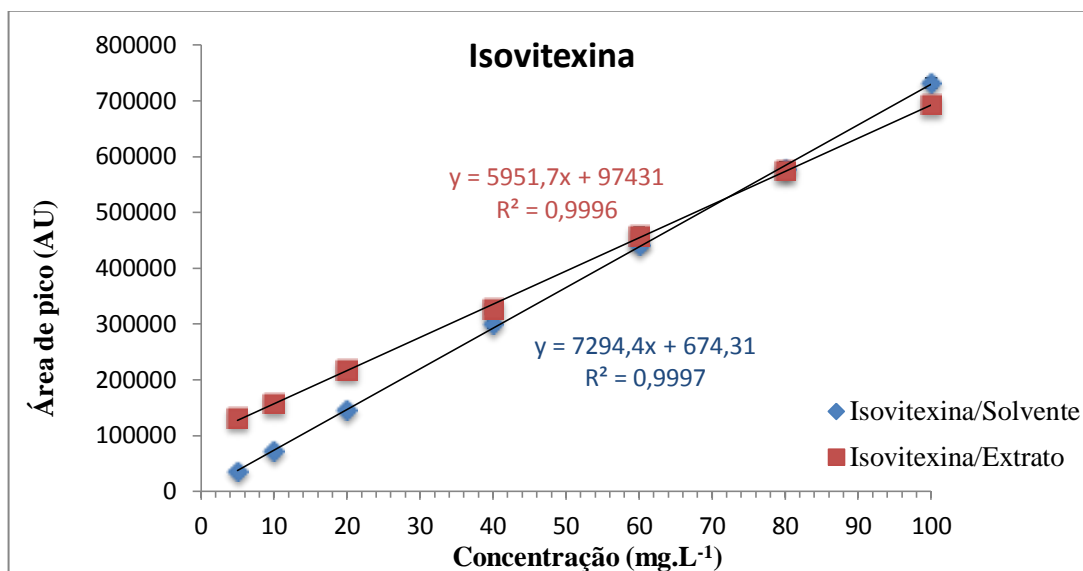


FIGURA 4.19 – Curvas analíticas no solvente e no extrato (exp.8) dos analitos orientina, isoorientina e isovitexina.

A Figura 4.19 ilustra as curvas analíticas obtidas no solvente e no extrato para orientina, isoorientina e isovitexina, a partir das concentrações selecionadas. A Tabela 4.15 resume os valores dos coeficientes de correlação obtidos, bem como, a área correspondente à concentração da curva analítica e a equação da reta, calculada a partir do método dos mínimos quadrados, para cada analito.

TABELA 4.15 Parâmetros da curva de calibração no solvente

Analito	Concentração real (mg.L ⁻¹)	Área média	Eq. da reta: y = ax + b	Coefficiente de correlação (R ²)
Orientina	5	31511	y = 6506,7x - 2441,7	0,9999
	10	62430		
	20	125283		
	40	256864		
	60	390651		
	80	519370		
	100	646407		
Isoorientina	5	36638	y = 7358,6x - 1381	0,9999
	10	71300		
	20	142909		
	40	292710		
	60	444145		
	80	589800		
	100	730775		

Isovitexina	5	35901	$y = 7294,4x + 674,31$	0,9997
	10	72225		
	20	145131		
	40	299238		
	60	440553		
	80	577359		
	100	732058		

Observou-se na Tabela 4.15 que os coeficientes de correlação (R^2) para os orientina, isoorientina e isovitexina correspondem a 0,9999, 0,9999 e 0,9997, respectivamente. Tais valores estão superiores a 0,99, ou seja, coerentes com a normativa utilizada.

4.9.4. Recuperação e Precisão

Neste tópico discute-se os resultados da recuperação e da precisão. De modo que pôde-se afirmar que a recuperação foi realizada a partir de uma solução padrão de orientina, isoorientina e isovitexina, que foi adicionada à amostra em três níveis de concentrações: 10, 20 e 40 mg.L⁻¹ (alto, médio e baixo), antes do processo de extração. Já a precisão foi avaliada nas mesmas concentrações, a partir dos cálculos do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação, dividindo o valor do desvio padrão pela concentração média e multiplicada por 100. A Tabela 4.16 ilustra os resultados obtidos na recuperação e precisão.

TABELA 4.16 – Resultados dos ensaios de recuperação e precisão para o extrato fortificado experimento 8 (ultra-turax).

Analito	Concentração final (mg.L ⁻¹)	Recuperação (n = 3) (%)	Precisão - Desvio padrão relativo (%)
Orientina	10	105,20	1,48
	20	103,53	2,15
	40	104,31	0,22
Isoorientina	10	105,03	1,52
	20	103,92	1,20
	40	106,34	0,34
Isovitexina	10	99,39	3,86
	20	101,24	2,74
	40	100,99	1,58

Observou-se na Tabela 4.16 que os valores obtidos de recuperação para os analitos estudados encontram-se na faixa de 99,0 - 106,0%, concluindo-se que os valores encontram-se dentro do intervalo permitido pela normativa, 70-120%, obtendo-se uma boa recuperação. Observou-se também os valores de precisão encontram-se abaixo de 5%, o qual encontra-se dentro dos limites estabelecidos pela normativa.

4.9.5. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os valores do desvio padrão e o coeficiente angular da equação da reta são parte dos cálculos do LD e LQ, que foram apurados conforme descrito no item 3.11.5. A Tabela 4.17 ilustra os resultados obtidos.

TABELA 4.17 – Resultados do Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).

Flavonoides	LD (mg.L ⁻¹)	LQ (mg.L ⁻¹)
Orientina	0,66	1,98
Isoorientina	0,87	2,62
Isovitexina	1,33	4,01

De acordo com a Tabela 4.17, obteve-se os valores de LD e LQ, sendo LD equivalente a 0,66, 0,87 e 1,33 mg.L⁻¹, os quais representam a menor concentração que pode-se detectar (não necessariamente quantificar) dos flavonoides orientina, isoorientina e isovitexina, respectivamente; e em relação ao LQ observou-se que as concentrações 1,98, 2,62 e 4,01 mg.L⁻¹ são as menores para se determinar os flavonoides, respectivamente.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos dados apresentados neste trabalho, pode-se concluir que os objetivos foram atingidos com sucesso. Foi possível desenvolver, validar e aplicar métodos analíticos verdes para a extração dos três flavonoides selecionados, da casca do maracujá (resíduo). Utilizando diferentes proporções de etanol (entre outras variáveis) por meio de métodos de extração baseado em ultra-turrax, ultrassom e microondas, e estimou-se ainda a eficiência da extração e o consumo energético dos métodos, bem como o grau verde através da Estrela Verde. A técnica UPLC-PDA mostrou-se satisfatória na identificação dos flavonoides, e na quantificação dos mesmos quando realizou a etapa de validação.

Aplicando-se o planejamento fatorial 2^3 para o estabelecimento do método de extração por ultra-turrax, e alterando-se as variáveis razão amostra/solvente (0,05 - 0,10), proporção de etanol (30 - 70%) e o tempo (2 - 8 min), obteve-se que a variável proporção de etanol é a mais significativa dentre as estudadas, conseguindo uma influência positiva, ou seja, quanto maior a proporção de etanol maior a quantidade dos analitos extraídos. Desta forma, extraiu-se do experimento 8, realizado nas condições: 0,10 razão amostra/solvente, 70% proporção de etanol, e 8 min de extração, $0,34 \pm 0,02$, $1,11 \pm 0,02$ e $0,94 \pm 0,02$ mg.g⁻¹ de orientina, isoorientina, e isovitexina, respectivamente, a maior quantidade dos analitos extraída dentre os métodos avaliados.

O mesmo foi realizado o método baseado em ultrassom, em que planejamento fatorial 2^3 com ponto central, alterando-se as variáveis razão amostra/solvente (0,05; 0,07; e 0,10), proporção de etanol (30, 50 e 70%) e o tempo (15, 38 e 60 min), obteve-se que a variável razão amostra/solvente é a mais significativa dentre as estudadas, atingindo uma influência negativa, ou seja, quanto menor a razão amostra/solvente maior a quantidade dos analitos extraídos. Desta forma, o experimento 1, realizado nas condições: 0,05 razão amostra/solvente, 30% proporção de etanol, e 15 min de extração, extraiu-se $0,70 \pm 0,03$, $0,68 \pm 0,03$, e $0,17 \pm 0,00$ mg.g⁻¹ de orientina, isoorientina, e isovitexina, respectivamente.

Já o planejamento fatorial 2^4 com ponto central foi aplicado para o método de extração por microondas, alterando-se as variáveis razão amostra solvente (0,05; 0,07; e 0,10), proporção de etanol (30; 40; e 50%), tempo (5; 15; e 25 min) e a temperatura (60; 90; e 120 °C), compreendeu-se que a variável tempo é a mais significativa para a extração dos analitos orientina e isoorientina, além disso a temperatura também foi significativa para a isovitexina, obtendo uma influência negativa para a variável 3 e positiva para a variável 4, ou seja, quanto menor o tempo e maior a temperatura, maior a quantidade dos analitos extraídos.

Desta forma, do experimento 10, realizado nas condições: 0,10 razão amostra/solvente, 30% proporção de etanol, 5 min de tempo e 120 °C temperatura, extraiu-se $0,82 \pm 0,03$, $0,94 \pm 0,03$ e $0,34 \pm 0,01$ mg.g⁻¹ de orientina, isoorientina, e isovitexina, respectivamente.

Para estimar a eficiência dos métodos de extração, somou-se as quantidades em massa de flavonoides estudados extraídas do melhor experimento de cada método de extração. Desta forma, o ultra-turrax apresentou uma maior quantidade com o experimento 8, no valor de 2,39 mg.g⁻¹. Os demais apresentaram 1,56 mg.g⁻¹ (no experimento 1) do ultrassom, e 2,10 mg.g⁻¹ (no experimento 10) de microondas. O gasto energético também foi avaliado para cada método, e novamente o experimento 8 (ultra-turrax) foi o que apresentou o menor valor, com um consumo de 16,3 W.h. Enquanto que o experimento 1 (ultrassom) consumiu 25 W.h e o experimento 10 (microondas) consumiu 66,4 W.h. Apesar do experimento 8 do ultra-turrax utilizar 3 minutos de extração a mais, do que o experimento 1 do microondas, a diferença de energia elétrica consumida entre eles é de aproximadamente 4x maior, fazendo que o ultra-turrax seja a técnica que gasta menos energia e maior extração dos analitos.

Avaliando-se o grau verde dos métodos de extração estudado, pode-se perceber que o ultra-turrax apresentou um grau verde maior, ou seja, foi o método de extração que mais atendeu os 12 Princípios da QV. A validação do método analítico foi realizada nas condições colocadas ao experimento 8 do método de extração do ultra-turrax. Sendo assim, avaliou-se os parâmetros, como, especificidade, linearidade, recuperação, precisão, LD e LQ, demonstraram estar dentro da especificidade da normativa utilizada (ICH). Como perspectiva futura, dentro do contexto de biorrefinaria, é possível inferir que os resultados deste trabalho poderão ser aplicados a maiores escalas. Os pontos centrais, aqui abordados, podem também, de modo independente (ou em conjunto), colaborar para o aprofundamento de pesquisas futuras que tratem sobre a extração de flavonoides, a partir de procedimentos de extração e métodos analíticos verdes, como ultra-turrax, ultrassom e microondas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANASTAS, P.; WARNER, J. Green Chemistry: theory and practice. New York: Oxford University Press, 1998.

AYRES, A. S.F.S.J; ARAÚJO, L. L. S.; SOARES, T. C; COSTA, G. M; REGINATTO, F. H; RAMOS, F. A; CASTELLANOS, L.; SCHENKEL, E. P; SOARES-RACHETTI, V. P; ZUCOLOTO, S. M; GAVIOLI E. C. "Comparative central effects of the aqueous leaf extract of two populations of *Passiflora edulis*". Revista Brasileira de Farmacognosia, **25**, 2015.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G; BIANCHI, M. L. P. "Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas". Alim. Nutr., Araraquara, 15: 3, 2004.

BERNACCI, L. C.; SOAREA-SCOTT, M.D.; JUNQUEIRA, N. T. V.; PASSOS, I. R. S.; MELETTI, L. M. M. "*Passiflora edulis* Sims: the correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors)". Rev. Bras. Frutic. ,30:2, 2008.

BRASIL (IBGE). Produção Agrícola Municipal: Culturas temporárias e permanentes. Rio de Janeiro, v.43, p.1-62, 2016. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2016_v43_br.pdf>. Acesso em: 01 out. 2017.

CARREIRA, R. L.; RAMOS, C. S.; SILVA, M. R; JUNIOR, C. O L; SILVESTRE, M. P. C.; PIROZI, M. R. "Emprego de metodologia enzimática na obtenção de extratos protéicos de farinha de trigo". Quím. Nova, 32:4, 2009.

CASS, Q.; CASSIANO, N. Cromatografia Líquida. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

CAVALHEIRO, C. V. Extração de Compostos Fenólicos Assistida por Ultrassom e Determinação de Ácidos Graxos e Minerais em Folhas de *Olea Europae* L. Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos - UFSM, 2013. Dissertação de Mestrado, 93 p.

CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A.; MEULLEMIESTRE, A.; FABIANO-TIXIER, A.; ABERT-VIAN, M. "Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review". Ultrasonics Sonochemistry, **34**, 2017.

COELHO, A. A.; CENCI, S. A.; RESENDE, E. D. "Rendimento em suco e resíduos do maracujá em função do tamanho dos frutos em diferentes pontos de colheita para o armazenamento". Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, 13:1, 2011.

CONSTABLE, D. J. C.; CURZONS, A. D.; CUNNINGHAM, V. L. "Metrics to 'green' chemistry - which are the best?". Green Chemistry, **6**, 2002.

CORREA, A. G.; ZUIN, V. G. Química Verde: Fundamentos e Aplicações. São Carlos: EdUFSCar, 2009.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. "Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório". Revista Virtual de Química, 1:2, 2009.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. "Cromatografia um breve ensaio". Quím. nova na escola, **7**, 1998.

E. M. KONTA; M. R. ALMEIDA; C. L. AMARAL; J. D. C. DARIN; V. V. ROSSO; A. Z. MERCADANTE; L. M. G. ANTUNES; M. L. P. BIANCHI. "Evaluation of the antihypertensive properties of yellow passion fruit pulp (*Passiflora edulis* Sims f.flavicarpa Deg) in spontaneously hypertensive rats". Phytotherapy Research, **28**, 2013.

EDUCA. Construção da Estrela Verde. Catálogo digital de verdura de atividades laboratoriais para o ensino da Química Verde. Disponível em: <http://educa.fc.up.pt/catalogo/pt/construcao_ev>. Acesso em: 03 jan 2018.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. (Eds.). Maracujá: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Brasília, DF: Embrapa, 2016.

FARIAS, L. A.; FÁVARO, D. I. T. "Vinte anos de química verde: conquistas e desafios". Quím. Nova, **34**:6, 2011.

FERREIRA, B. L.; CHAVES, E. S, VIALICH, J., SAUER, E. "Ultrasound-assisted extraction from chocolate powder samples for the determination of Fe, K and Na ". Brazilian Journal of Food Technology, **17**:3, 2014.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. "Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial". Quím. Nova, **22**:5, 1999.

FILHO, O. F. Equilíbrio iônico Aplicações em Química Analítica. São Carlos: Edufscar, 2016.

FREIRE, V. F.; SILVA, G. R.; YARIWAKE, J. H. "Targeted-Analysis of β -Carboline alkaloids in passionfruit ("Maracujá") by SBSE (PDMS)-LC/Flu and UPLC-MS". J. Braz. Chem. Soc, **29**:4, 2018.

FREITAS, P. C.; CARVALHO, R. M.; SILVAB, J. S. A.; PRADO, T.; DUARTE, E. R.; FRESCURAB, V. L. A.; CHAVESA, E. S. "Extração assistida por ultrassom para determinação colorimétrica de ferro em solo: uma comparação com espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado". Quím. Nova, **38**:4, 2015.

GIACON, E. C. Maracujá azedo amarelo. 14 nov 2016. il.color. Disponível em: <<http://ciprest.blogspot.com.br/search?q=Maracuj%C3%A1+Azedo>>. Acesso em: 14 mar 2018.

_____. Maracujá doce amarelo. 23 mar 2017. il.color. Disponível em: <<http://ciprest.blogspot.com.br/2017/03/maracuja-doce-amarelo-passiflora-alata.html>>. Acesso em: 15 mar 2018.

GOMES, S. V. F. Aplicação do Planejamento Box-Behnken na Otimização de Método de extração de flavonoides usando a extração acelerada com solventes (ASE) e quantificação de marcadores químicos por CLAE-DAD-UV em espécies do gênero *Passiflora*. Bahia, Programa de Pós-Graduação em Química - Instituto de Química - UFBA: Tese de doutorado, 2013. 161 p.

GOMES, S. V. F.; PORTUGAL, L. A.; ANJOS, J. P.; JESUS, O. N.; OLIVEIRA, E. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. "Accelerated solvent extraction of phenolic compounds

exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species". *Microchemical Journal*, 132, 2017.

GOULART, M. O. F.; OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. "Fontes vegetais naturais de antioxidantes". *Quím. Nova*, 32:3, 2009.

HANOT, V.; GOSCINNY, S.; DERIDDER, M. "A simple multi-residue method for the determination of pesticides in fruits and vegetables using a methanolic extraction and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Optimization and extension of scope". *Journal of Chromatography A*, 1384, 2015.

HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. "Otimização de método para determinação de flavonóis e flavonas em frutas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando delineamento estatístico e análise de superfície resposta". *Quím. Nova*, 31:6, 2008.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1), 2005. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf>. Acesso em: 01 jul. 2017.

JARDIM, I. C. S. F.; MALDANER, L. "UPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes". *Scientia Chromatographica*, 4 (3), 2012.

JUNIOR, S. V (Ed.). *Biorrefinarias: cenários e perspectivas*. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2011.

KEITH, L. H.; GRON, L. U.; YOUNG, J. L. *Green Analytical Methodologies*. *Chem. Rev*, 107:6, 2007.

KOEL, M.; KALJURAND, M. "Application of the principles of green chemistry in analytical chemistry". *Pure Appl. Chem*, 78:11, 2006.

LANÇAS, F. M. "A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massa: finalmente "compatíveis"?" *Scientia Chromatographica*, 1:2, 2009.

LANGASSNER, S. M. Z. *Avaliação da Composição Química e Atividades Biológicas de Espécies de Passiflora*. Florianópolis, Pós-Graduação em Farmácia - UFSC, 2009. Tese de doutorado, 167 p.

LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C. C. "Green chemistry – Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa". *Quím. Nova*, 26:1, 2003.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S. "Flavonóides". *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, 3: 14, 2000.

MACHADO, H.; T. J. NAGEM; V. M. PETERS; C. S. FONSECA; T. T. OLIVEIRA. "Flavonóides e seu potencial terapêutico". *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução, Juiz de Fora*, 27:1/2, 2008.

MACIEL, M. A. M; PINTO, A. C; JUNIOR, V. F. V; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. "Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares". *Quím. Nova*, 25:3, 2002.

- MALACRIDA, C. R.; JORGE, N. "Yellow passion fruit seed oil (*Passiflora edulis* f.flavicarpa): physical and chemical characteristics". Brazilian archives of biology and technology, 55:1, 2012.
- MELLETTI, L. M. M. "Avanços na cultura do maracujá no Brasil". Rev. Bras. Frutic, Jaboticabal, E, 2011.
- NAMIEŚNIK, J. "Green analytical chemistry - Some remarks". J. Sep. Sci, 24, 2001.
- NASCENTES, C. C.; KORN, M.; SOUSA, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Use of ultrasonic baths for analytical applications: a new approach for optimisation conditions". J. Braz. Chem. Soc., 12:1, 2001.
- NETO, B. D. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. "25 anos de quimiometria no Brasil". Quím. Nova, 29:6, 2006.
- NEXO Jornal. Banana, café, mandioca: onde são cultivados vegetais e grãos no Brasil, 2018. Disponível em: <https://www.nexojournal.com.br/grafico/2018/02/07/banana-caf%c3%a9-mandioca-onde-s%c3%a3o-cultivados-vegetais-e-gr%c3%a3os-no-brasil?utm_campaign=echobox&utm_m>. Acesso em: 28 fev 2018.
- NORIEGA, P.; MAFUD, D. F.; SOUZA, B.; SOARES-SCOTT, M. RIVELLI, D. P; BARROS, S. B. M.; BACCHI, E. M. Applying design of experiments (DOE) to flavonoid extraction from *Passiflora alata* and *P. edulis*. Brazillian Journal of Pharmacognosy, 2012.
- OTIFY, A.; GEORGE, C.; ELSAYED, A.; FARAG, M.A. "Mechanistic evidence of *Passiflora edulis* (Passifloraceae) anxiolytic activity in relation to its metabolite fingerprint as revealed via LC-MS and chemometrics". Food Funct, 6:12, 2015.
- PAIVA, S. R.; FONTOURA, L. A.; FIGUEIREDO, M. R.; MAZZEI, J. L.; KAPLAN, M. A. C. "Perfil cromatográfico de duas espécies de plumbaginacear: plumbago scandens L. E plumbago auriculata LAM". Quim. Nova, 25:5, 2002.
- PEREIRA, E. F. Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados. EdUFSCar, São Carlos, 2015.
- PERON, A. P.; SILVA, L. R.; MARTINS, L. V.; CALOU; I. B. F.; MEIRELES DE DEUS, M. S.; FERREIRA, P. M. P. "Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico". Acta Toxicol. Argent, 23:1, 2015.
- PRADO, A. G. S. "Química verde, os desafios da química no novo milênio". Qui. Nova, 26:5, 2003.
- PROESTOS, C.; KOMAITIS, M. "Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds". LWT - Food Science and Technology, 41:4, 2008.
- RESENDE, F. A. Estudo do Potencial Antimutagênico, Mutagênico, Estrogênico e Antibacteriano de Flavonoides. Araraquara, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, 2011. Tese de doutorado. 183 p.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. "Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos". Qui. Nova, 27:5, 2004.

- RIBEIRO, M. G. T. C.; COSTA, D. A.; MACHADO, A. A. S. C. "'Green Star': a holistic green chemistry metric for evaluation of teaching laboratory experiments". *Green Chemistry Letters and Reviews*, 3:2, 2010.
- RIBEIRO, M. G. T. C.; COSTA, D. A.; MACHADO, A. A. S. C. "Uma métrica gráfica para a avaliação holística da verdures de reações laboratoriais "Estrela Verde"". *Qui. Nova*, 33:3, 2010.
- SENA, L. M. Atividade Neurofarmacológica do Pericarpo dos Frutos de *Passiflora edulis* Variedade Flavicarpa Degener (maracujá) em Camundongos: Envolvimento de Flavonoides C-Glicosídeos. Florianópolis, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC, 2009. Tese de Doutorado, 164 p.
- SHELDON, R. A. "Metrics of green chemistry and sustainability: past, present, and future". *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 6:1, 2018.
- SILVA, F. M. D.; LACERDA, P. S. B. D.; JUNIOR, J. J. "Desenvolvimento sustentável e química verde". *Qui. Nova*, 28:1, 2005.
- SILVA; E. C. C; MUNIZ; M. P; NUNOMURA; R. C. S; NUNOMURA; S. M; ZILSE G. A. C. "Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas". *Quim. Nova*, 36:5, 2013.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. Introduction to modern liquid chromatography. 3ª. ed. New Jersey: Wiley, 2010.
- STANCIU, O.; JUAN, C.; MIERE, D.; LOGHIN, F.; MAÑES, J. "Analysis of enniatins and beauvericin by LC-MS/MS in wheat-based products". *CYTA – JOURNAL OF FOOD*, 15:3, 2017.
- SWARTZ, M. E. "UPLCTM: an introduction and review". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28, 2005.
- TOBISZEWSKI M; MARĆ M; GALUSZKA A; NAMIEŚNIK J. "Green chemistry metrics with special reference to green analytical chemistry". *Molecules*, 20:6, 2015.
- TSUKUI, A.; REZENDE, C. M. "Extração assistida por micro-ondas e química verde". *Rev. Virtual Quim*, 6:6, 2014.
- WOSCHA, L.; SANTOS, K. C.; IMIG, D. C.; SANTOS, C. A. M. "Comparative study of *Passiflora* taxa leaves: II. A chromatographic profile". *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27, 2017.
- XU, W.; ZHAI, J.; CUI, Q.; LIU, J.; LUO, M.; FU, Y.; ZU, Y. "Ultra-turrax based ultrasound-assisted extraction of five organic acids from honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.) and optimization of extraction process". *Separation and Purification Technology*, 166, 2016.
- YU, Jianfeng; LOU, Qi; ZHENG, Xiangyang; CUI, Zhengwei; FU, Jian. "Sequential combination of microwave- and ultrasound-assisted extraction of total flavonoids from *Osmanthus fragrans* Lour. Flowers". *Molecules*, 22, 2017.
- ZANDONAI, D. P. A Inserção da Química Verde no Curso de Licenciatura em Química do DQ-UFSCAR: Um Estudo de Caso. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2013. Dissertação de Mestrado. 111 p.

ZERAIK, M. L. Estudo Analítico dos Flavonoides dos Frutos do Maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). São Carlos, Instituto de Química de São Carlos - USP, 2010. Tese de Doutorado, 191 p.

ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H.; WAUTERS, J.; TITS, M.; ANGENOT, L.. "Analysis of Passion Fruit rinds (*Passiflora edulis*): isoorientin quantification by HPLC and evaluation of antioxidant (radical scavenging) capacity". *Quim. Nova*, 35:3, 2012.

ZERAIK; M. L.; PEREIRA; C. A. M.; ZUIN; V. G.; YARIWAKE; J. H. "Maracujá: um alimento funcional?". *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20 (3), 2010.

ZOTOU, A. "An overview of recent advances in HPLC instrumentation". *Central European Journal of Chemistry*, 10:3, 2012.

ZUCOLOTTO, S. M.; GOULART, S.; MONTANHER, A. B.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S. "Bioassay-Guided isolation of anti-inflammatory C-glucosylflavones from *Passiflora edulis*". *Planta Med*, **75**, 2009.

ZUIN, V. G.; RAMIN, L. Z. "Green and sustainable separation of natural products from agro industrial waste: challenges, potentialities, and perspectives on emerging approaches". *Top Curr Chem*, **376**, 2018.