

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

**BIORREFINARIA APLICADA À CADEIA DE SOJA: UM
ESTUDO DE CASO DE EXTRAÇÃO VERDE E
SUSTENTÁVEL DE ISOFLAVONAS**

Aylon Matheus Stahl*

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vânia Gomes Zuin
Coorientador: Prof. Dr. Moacir Rossi Forim

***bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**

São Carlos – SP
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Aylon Matheus Stahl, realizada em 29/04/2021.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Moacir Forim Rossi (UFSCar)

Prof.ª Dr.ª Renata Colombo (USP)

Prof.ª Dr.ª Roberta Cerasi Urban (UFSCar)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

“> A ciência por si pode se provar cínica

No entanto, não se deve esquecer que existe um elemento científico em todas as coisas,

A importante verdade é esta:

Eu sou o mestre do meu destino, eu sou o capitão de minha alma”

Dedico o trabalho a mim,
para que eu leia, no futuro, esta dedicatória com orgulho e empatia.
E, com sorte, lembre-me que sempre é possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente meus familiares, em especial meus pais Sandra e Edmilson, pois forneceram os tijolos que constroem minhas bases.

Em seguida à orientação da profa. Vânia Zuin, seus ensinamentos e as inúmeras possibilidades que ela me permitiu e continua a permitir.

Aos meus grandes amigos e amigas que ajudaram a desenvolver este trabalho, com destaque para Karine Zanotti, Danielle da Silva Francischini e Mateus Lodi Segatto.

Aos membros e ex-membros do GPQV, grupo de pesquisa que constituo, pelos momentos únicos que tivemos.

À banca convidada, constituída pela profa. Roberta Cerasi Urban e profa. Renata Colombo, pois ofereceram apontamentos ricos ao trabalho.

Ao coorientador prof. Moacir Forim pelo cuidado para comigo na reta final do mestrado.

Ao professor e à professora que aceitaram assistir ao seminário dado por mim, Felipe Christoff Wouters e Maria Olimpia Rezende, por serem solícitos e ajudarem a construir os argumentos neste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa pelo fomento durante esses dois anos de mestrado.

À CAPES e FAPESP, pois também foram órgãos de fomento que se apresentaram importantes para o desenvolvimento da pesquisa.

À todas as minhas professoras e aos professores no ensino primário e médio, pois sem eles não estaria aqui.

À todas as minhas professoras e aos professores de graduação e pós-graduação, porque com o toque inspirador de cada um deles pude me direcionar para o mestrado.

E por último, Nicholas Vendramin Ueda, meu namorado, pois sou anacronicamente grato a você.

E a todos estes acrescento que sou eternamente agradecido.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APROSOJA	Associação Brasileira dos Produtores de Soja
C _d	Concentração calculada de daidzeína
C _g	Concentração calculada de genisteína
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
COPLACANA	Cooperativa dos Plantadores de Cana do Estado de São Paulo
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DAI	Daidzeína
EAH	Extração assistida por homogeneizador de alta velocidade
EAU	Extração assistida por ultrassom
EtOH	Etanol
Exp.	Experimento
FS	Fatores sustentáveis
GEN	Genisteína
GPQV	Grupo de Estudo e Pesquisa em Química Verde, Sustentabilidade e Educação
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano)
LD	Limites de detecção
LFDA	Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária
LQ	Limites de quantificação
m/v	Razão de massa por volume
PCC	Planejamento composto central

PFC	Planejamento fatorial completo
PFF	Planejamento fatorial fracionário
PTFE	Politetrafluoretileno
v/v	Razão de volume por volume
V_n	Variável n, sendo n um número natural de 1 a 4, referente a uma variável que se explicita em cada parte específica do texto

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Exemplo de planejamento fatorial completo para duas variáveis.	13
TABELA 1.2 - Exemplo de planejamento composto central para duas variáveis.	14
TABELA 3.1 - Variáveis estudadas e valores adotados em nível máximo (+1) e mínimo (-1) para extração assistida por homogeneizador de alta velocidade. .	24
TABELA 3.2 - Descrição codificada dos experimentos dada pelo planejamento fatorial fracionário para extração assistida por homogeneizador de alta velocidade.....	24
TABELA 3.3 - Variáveis estudadas e valores adotados em nível máximo (+1) e mínimo (-1) para extração assistida por ultrassom.	25
TABELA 3.4 - Descrição codificada dos experimentos dada pelo planejamento fatorial completo para extração assistida por ultrassom.	25
TABELA 3.5 - Variáveis estudadas e valores adotados nos cinco diferentes níveis para extração assistida por homogeneizador de alta velocidade.....	26
TABELA 3.6 - Variáveis estudadas e valores adotados nos cinco diferentes níveis para extração assistida por ultrassom.....	27
TABELA 3.7 - Descrição codificada dos experimentos dada pelo planejamento de composto central para extração assistida por ultrassom.	28
TABELA 3.8 - Pontos teóricos da curva analítica e respectivas concentrações para a curva com analitos no solvente.	33
TABELA 3.9 - Pontos teóricos da curva analítica e respectivas concentrações para a curva com analitos na presença da matriz.....	34
TABELA 4.1 - Composição da fase móvel durante o tempo e condições gerais do método.....	41
TABELA 4.2 - Parâmetros de regressão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e coeficiente de correlação das curvas construídas.	43
TABELA 4.3 - Tempos de retenção médios (em min.) dos picos dos analitos (solução de trabalho) e dos picos investigados nos extratos.....	45

TABELA 4.4 - Resultados do planejamento fatorial fracionário das extrações assistidas por homogeneizador de alta velocidade para daidzeína e genisteína.	50
TABELA 4.5 - Resultados do planejamento composto central das extrações assistidas por homogeneizador de alta velocidade para daidzeína e genisteína.	55
TABELA 4.6 - Resultados do planejamento fatorial completo das extrações assistidas por ultrassom para daidzeína e genisteína.	57
TABELA 4.7 - Resultados do planejamento composto central das extrações assistidas por ultrassom para daidzeína e genisteína.	61
TABELA 4.8 - Rendimentos de extração de daidzeína e genisteína obtidos por CARNEIRO <i>et al.</i> (2020) de diferentes partes da planta deixadas pela colheitadeira (resíduo agrícola).....	66
TABELA 4.9 - Fatores sustentáveis para os experimentos com maior rendimento de cada técnica e planejamento aplicado.	67
TABELA 4.10 - Valores dos fatores sustentáveis para os experimentos mais eficientes de cada técnica e planejamento estudado.	68

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Produção mundial de soja por país no ano de 2018.	2
FIGURA 1.2 - Destinos da soja produzida no Brasil.....	2
FIGURA 1.3 - Etapas simplificadas de processamento de soja para obtenção de grãos, farelo e óleo.	3
FIGURA 1.4 - Estrutura das isoflavonas e de grupos que com elas conjugam....	6
FIGURA 1.5 - Esquema comparativo das condições de rompimento de células.	9
FIGURA 1.6 - Equipamentos utilizados para extração: a) homogeneizador de alta velocidade; b) banho ultrassônico.....	11
FIGURA 3.1 - Resíduo agroindustrial da pré-limpeza (esquerda) e o mesmo resíduo após a moagem e peneiração (direita).	22
FIGURA 4.1 - Cromatogramas referentes à separação realizada com gradiente amplo em duas fases estacionárias distintas: Cromatograma 1- Acquity HSS C18 e; Cromatograma 2 - Acquity BEH C8. Os picos investigados dos dois analitos estão indicados*.	40
FIGURA 4.2 - Cromatogramas referentes à separação realizada com composição de fase móvel diferente em fase estacionária BEH C8: Cromatograma 2 - água ultrapura acidificada e acetonitrila; Cromatograma 3 - água ultrapura acidificada e metanol. Os picos investigados dos dois analitos estão indicados*.....	41
FIGURA 4.3 - Cromatograma referente à separação realizada na coluna BEH C8 com fase móvel de água ultrapura acidificada (0,1% ácido fórmico)*.....	42
FIGURA 4.4 - Representação gráfica das curvas de calibração da daidzeína (esquerda) e da genisteína (direita).	44
FIGURA 4.5 - Perfis de absorção UV-VIS das isoflavonas da soja. À esquerda, o perfil referente à daidzeína e, à direita, o perfil referente à genisteína.	46
FIGURA 4.6 - Comparação dos perfis de absorção de luz na faixa UV-VIS dos picos dos analitos nas soluções de trabalho e nos extratos. DAI (região superior) e genisteína (região inferior).	47
FIGURA 4.7 - Comparação dos picos investigados* sem (esquerda) e com adição (direita) de solução de trabalho dos analitos estudados.	48

FIGURA 4.8 - Efeitos percentuais das variáveis para o planejamento fatorial fracionário aplicado para extração assistida por homogeneizador de alta velocidade.....	51
FIGURA 4.9 - Efeito absoluto das variáveis para o planejamento fatorial fracionário aplicado para extração assistida por homogeneizador de alta velocidade.....	52
FIGURA 4.10 - Efeitos percentuais das variáveis para o planejamento fatorial completo aplicado para extração assistida por ultrassom.	58
FIGURA 4.11 - Efeitos absolutos das variáveis para o planejamento fatorial completo aplicado para extração assistida por ultrassom.	59
FIGURA 4.12 - Melhores resultados baseados em rendimentos de extração para os dois procedimentos de extração aplicados e os respectivos planejamentos realizados.....	71

RESUMO

BIORREFINARIA APLICADA À CADEIA DE SOJA: EXTRAÇÃO VERDE E SUSTENTÁVEL DE ISOFLAVONAS. O Brasil apresenta potencial para ser o maior produtor mundial de soja (*Glycine max*), sendo, em 2020, responsável pela produção de 124 Mt da oleaginosa. Entretanto, cerca de 70% da massa produzida acaba sendo transformada em resíduo durante as inúmeras etapas de processamentos para geração de óleo, farelo e grãos. Esses resíduos agroindustriais possuem substâncias de alto valor agregado que podem ser extraídas e reintegradas à cadeia produtiva por meio de técnicas verdes. Considerando novas práticas alinhadas ao desenvolvimento sustentável para o enfrentamento dos desafios globais, como a economia circular e o uso de processos químicos verdes e sustentáveis, o conceito de biorrefinaria se apresenta como uma maneira economicamente viável para atingir tais objetivos. Este conceito busca processos criativos de extração e transformação desse material residual que sejam sustentáveis em seu cerne. Portanto, a investigação de subprodutos do processamento de soja é o primeiro passo para reinseri-los na cadeia produtiva através dos conceitos de biorrefinaria e química verde e sustentável, firmando passos iniciais para uma economia não-linear. Assim, investigou-se a obtenção de extratos a partir de resíduos agroindustriais de soja contendo dois compostos bioativos: as isoflavonas de interesse comercial daidzeína e genisteína. Para extração das referidas substâncias, duas técnicas industrialmente escalonáveis foram empregadas: a extração assistida por homogeneizador de alta velocidade e a extração assistida por ultrassom. Para a otimização dos procedimentos, os seguintes tratamentos quimiométricos foram realizados: planejamento fatorial completo e planejamento fatorial fracionário, para seleção das variáveis mais relevantes para o maior rendimento de extração; e o planejamento de composto central, para criação de modelos matemáticos capazes de descrever os melhores parâmetros para extração. Com o intuito de

tornar o procedimento mais sustentável, as extrações foram realizadas apenas com misturas de água e etanol como solvente extrator, e também se desenvolveu um método cromatográfico para quantificação em um cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado ao detector de arranjo de diodos na faixa ultravioleta-visível. A fim de analisar a eficiência do uso de recursos nos experimentos, a métrica “fatores sustentáveis” foi empregada, considerando massa de amostra, volume de solvente, energia e tempo. O método cromatográfico elaborado se mostrou seletivo, linear e com limites de detecção e quantificação adequados para os extratos obtidos. Dentre as variáveis estudadas, a razão amostra-solvente e a composição do solvente extrator são as mais significativas para ambas as técnicas. Os maiores rendimentos de extração obtidos (em mg g⁻¹) para a extração utilizando homogeneizador foi de 0,11 para daidzeína e 0,07 para genisteína; e para extração em que se emprega o banho ultrassônico esse rendimento foi de 0,14 para daidzeína e 0,08 para genisteína. Ao analisar os resultados, alguns experimentos com rendimento de extração pouco menores apresentaram maior eficácia do uso de recursos considerando a massa do analito extraída. De maneira geral, mostrou-se que é possível adotar os resíduos agroindustriais de soja como fontes de moléculas comercialmente importantes e que a extração desses compostos bioativos da biomassa residual de processamento pode ser realizada de maneira eficaz e sustentável.

ABSTRACT

SOY BIOREFINERY: GREEN AND SUSTAINABLE EXTRACTION OF ISOFLAVONES. Brazil has the potential to be the world's largest producer of soybeans (*Glycine max*), being, in 2020, responsible for the production of 124 Mt of oilseeds. However, about 70% of the mass produced ends up being transformed into waste during the countless processing steps to generate oil, bran and grains. These agro-industrial residues have high added-value substances that can be extracted and reintegrated into the production chain using green techniques. Considering new practices aligned with sustainable development to face global challenges, such as the circular economy and the use of green and sustainable chemical processes, the concept of biorefinery presents itself as an economically viable way to achieve such objectives. This concept seeks creative processes for the extraction and transformation of this residual material that are sustainable in their core. Therefore, the investigation of by-products from soy processing is the first step to reinsert them in the production chain through the concepts of biorefinery and green and sustainable chemistry, establishing initial steps towards a non-linear economy. Thus, the extraction of two bioactive compounds from soy agro-industrial residues, the isoflavones of commercial interest daidzein and genistein, was investigated. For the extraction of these substances, two industrially scalable techniques were used: Extraction Assisted by High-Speed Homogenizer and Extraction Assisted by Ultrasound. For the optimization of procedures, the following chemometric treatments were performed: Full Factorial Design and Fractional Factorial Design, for the selection of the most relevant variables for higher extraction yields, and the Central Composite Design, for the creation of mathematical models capable of describing the best parameters for extraction. In order to make the procedure more sustainable, the extractions were performed only with mixtures of water and ethanol as the extraction solvent and, also, a chromatographic method was developed for quantification in an Ultra High

Performance Liquid Chromatograph coupled to a diode array detector in the ultraviolet-visible range. In order to analyze the efficiency of resources use of the experiments, the metric "sustainable factors" was employed, considering sample mass, solvent volume, energy and time. The chromatographic method developed proved to be selective, linear and with adequate limits of detection and quantification for the extracts obtained. Among the variables studied, the sample-to-solvent ratio and the composition of the extraction solvent are the most significant for both techniques. The highest extraction yield obtained (in mg g⁻¹) for extraction using homogenizer was 0.11 for daidzein and 0.071 for genistein; and for extraction using the ultrasonic bath it was 0.14 for daidzein and 0.082 for genistein. When analyzing the results, some experiments with slightly lower extraction yields showed greater efficiency in the use of resources considering the mass of the extracted analytes. In general, it was shown that it is possible to adopt agro-industrial residues as sources of commercially important molecules. These compounds extraction from processing residues can be carried out in an efficient and sustainable manner.

SUMÁRIO

1 -	Introdução	1
1.1 -	Soja: contexto global e nacional	1
1.2 -	Produtos, processamento e resíduos	3
1.3 -	Biorrefinaria e economia circular	4
1.4 -	Isoflavonas encontradas na soja e sua relevância	6
1.5 -	Química verde e sustentável	8
1.5.1 -	Métodos de extração	9
1.5.1.1 -	Extração assistida por ultrassom	11
1.5.1.2 -	Extração assistida por homogeneizador de alta velocidade	12
1.5.2 -	Planejamento de experimentos	12
1.5.3 -	Métricas	15
1.5.4 -	Análise	16
2 -	Objetivos	19
2.1 -	Objetivo geral	19
2.2 -	Objetivos específicos	19
3 -	Metodologia	21
3.1 -	Amostras e padrões	21
3.1.1 -	Amostra, caracterização e condicionamento	21
3.1.2 -	Padrões analíticos	22
3.2 -	Planejamento experimental	22
3.2.1 -	Triagem de variáveis	23
3.2.1.1 -	Planejamento fatorial fracionário para extração assistida por homogeneizador de alta velocidade	23

3.2.1.2 - Planejamento fatorial completo para extração assistida por ultrassom	24
3.2.2 - Otimização dos experimentos	26
3.2.2.1 - Planejamento composto central para extração assistida por homogeneizador de alta velocidade	26
3.2.2.2 - Planejamento composto central para extração assistida por ultrassom	27
3.3 - Extrações	28
3.3.1 - Extração assistida por homogeneizador de alta velocidade.....	28
3.3.1.1 - Planejamento fatorial fracionário para extração assistida por homogeneizador de alta velocidade	29
3.3.1.2 - Planejamento composto central para extração assistida por homogeneizador de alta velocidade	29
3.3.2 - Extração assistida por ultrassom.....	30
3.3.2.1 - Planejamento fatorial completo para a extração assistida por ultrassom	30
3.3.2.2 - Planejamento composto central para extração assistida por ultrassom	31
3.4 - Método cromatográfico.....	31
3.5 - Método de quantificação	32
3.6 - Critérios de validação do método analítico.....	34
3.6.1 - Linearidade.....	35
3.6.2 - Seletividade	35
3.6.3 - Limite de detecção e limite de quantificação.....	36
3.6.4 - Teste preliminar de recuperação do método cromatográfico	36
3.7 - Tratamento de dados	37
3.8 - Cálculo de fatores sustentáveis	38
4 - Resultados e discussões	39

4.1 -	Método cromatográfico.....	39
4.2 -	Validação do método analítico.....	42
4.3 -	Resultados das extrações.....	49
4.3.1 -	Resultados da extração por homogeneizador de alta velocidade	49
4.3.1.1 -	Resultados do planejamento fatorial fracionário para a extração assistida por homogeneizador de alta velocidade.....	49
4.3.1.2 -	Resultados do planejamento composto central para extração assistida por homogeneizador de alta velocidade	54
4.3.2 -	Resultados da extração assistida por ultrassom	56
4.3.2.1 -	Resultados do planejamento fatorial completo para a extração assistida por ultrassom.....	57
4.3.2.2 -	Resultados do planejamento composto central para a extração assistida por ultrassom.....	60
4.4 -	Comparação com outros estudos	63
4.4.1 -	Comparação das concentrações observadas entre analitos.....	63
4.4.2 -	Comparação quanto ao rendimento de extração	64
4.5 -	Fatores sustentáveis das extrações	66
4.6 -	Comparação das técnicas	70
4.6.1 -	Comparação entre os rendimentos de extração das técnicas aplicadas	70
4.6.2 -	Comparação dos fatores sustentáveis entre as técnicas estudadas	71
5 -	Conclusão.....	73
	REFERÊNCIAS	75
	APÊNDICE A	84
	APÊNDICE B	87
	APÊNDICE C	89

APENDICE D 91

APÊNDICE E..... 93

1 - Introdução

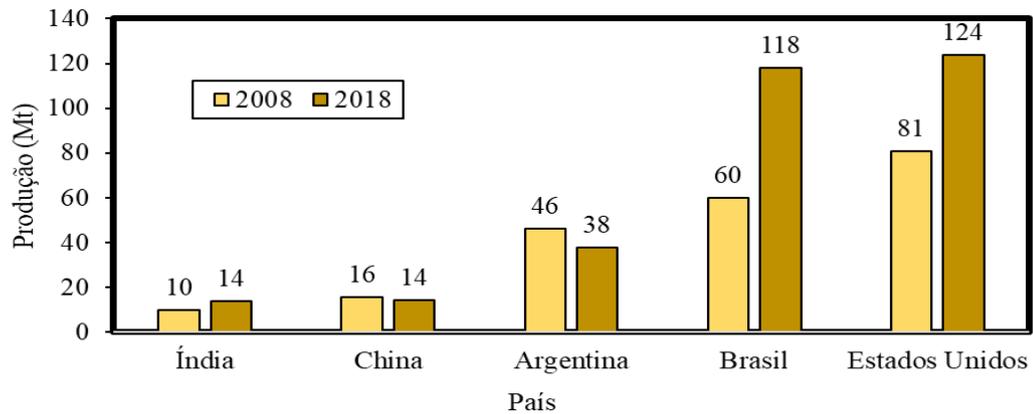
Nesta seção será realizada uma contextualização teórica sobre os principais assuntos desse trabalho, a saber: a cadeia de produção da soja, seu processamento e resíduos gerados durante ele; os conceitos de biorrefinaria e economia circular; os compostos bioativos de interesse presentes em soja; e a química verde e sustentável, bem como sua inserção no desenvolvimento de métodos analíticos de extração e quantificação de substâncias.

1.1 - Soja: contexto global e nacional

A soja é uma oleaginosa pertencente à espécie *Glycine max* (L.) Merrill. Originária da China, sua produção ganhou destaque no mundo com o crescimento acelerado nos Estados Unidos a partir de 1950, e no Brasil após a década de 1970 em decorrência de suas vastas aplicações – que se estendem à produção de óleo de cozinha, tofu e leite de soja, à confecção de biodiesel e de excipientes para o setor farmacêutico, e na formulação de cosméticos. O conteúdo proteico de suas sementes é de aproximadamente 40% comparado com sua massa, o maior dentre os vegetais cultivados globalmente, o que explica a importância do uso dessa leguminosa como ração para o setor pecuário (ALI, 2010). Dada essa infinidade de empregos possíveis, o também conhecido como feijão-chinês apresenta prospecto de aumento no seu cultivo até 2050 (REKOW, 2019).

Totalizando 1,25 milhões de km², a área de plantio desta leguminosa ocupava cerca de 0,85% da área continental do planeta em 2018 (FAO, 2018). A FIGURA 1.1 mostra, comparativamente, a produção de soja nos anos de 2008 e 2018 dos países que mais a cultivam, evidenciando o avanço da produção do grão tanto no Brasil como nos Estados Unidos. Para a safra de 2019/20, o rendimento nacional foi de aproximadamente 124 Mt (EMBRAPA, 2020) até agosto de 2020, e estima-se que mais de 4% do território brasileiro é ocupado por essas plantações (FAO, 2018).

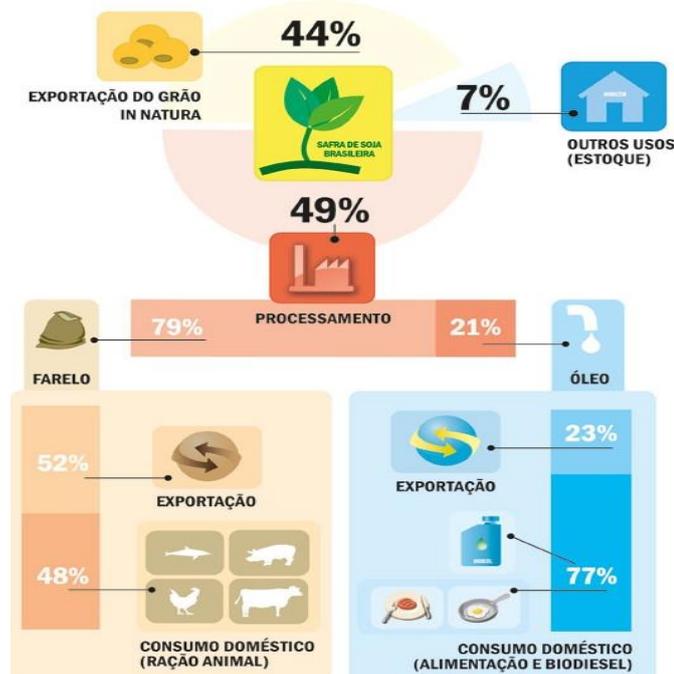
FIGURA 1.1 - Produção mundial de soja por país no ano de 2018.



Fonte: FAO, 2018.

Quanto aos seus usos, a soja originária do Brasil é em sua maior parte exportada, seja nas formas de grãos ou processadas em farelo e óleo, como avaliado pela Associação Brasileira dos Produtores de Soja (APROSOJA BRASIL) em 2016, com dados ilustrados na *FIGURA 1.2*. Em contrapartida, as previsões para a safra atual é de que 67% dos grãos sejam exportados (CONAB, 2020).

FIGURA 1.2 - Destinos da soja produzida no Brasil.



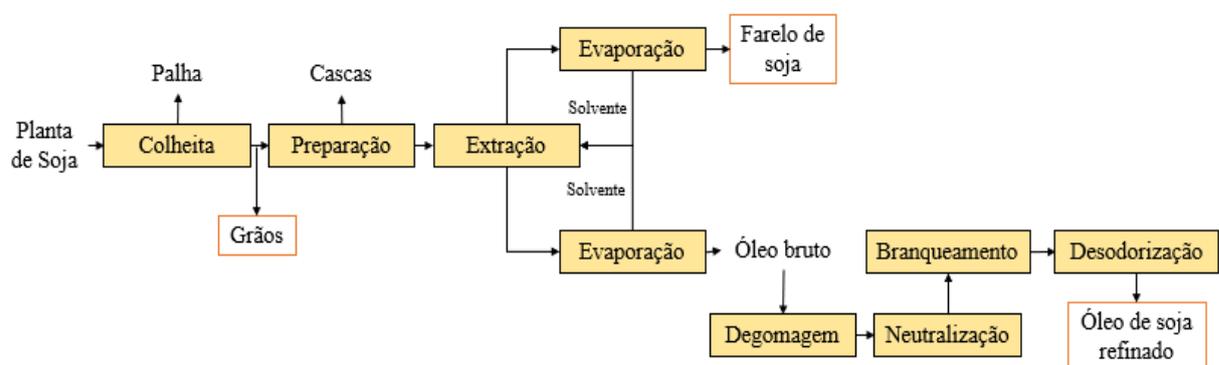
Fonte: APROSOJA BRASIL, 2016.

A alta ocorrência das exportações, tanto dos grãos quanto dos seus processados, geraram, em 2019, receita de U\$ 32,6 bilhões (EMBRAPA, 2020). Essa quantia explicita a importância desse commodity para a economia do país e, portanto, é mais um fator que sustenta o prospecto de crescimento do seu cultivo.

1.2 - Produtos, processamento e resíduos

Como resultado de sua importância, é comum ao agronegócio referir-se ao conjunto dos três produtos principais do cultivo da oleaginosa (grãos, farelo e óleo) como “complexo soja”. Para que esses sejam obtidos, a planta necessita passar por algumas etapas de processamento, como a limpeza e seleção para obtenção dos grãos e outros tratamentos físicos e químicos adequados para extração do óleo e aquisição do farelo (RAGHUVANSHI e BISHT, 2010). A FIGURA 1.3 mostra as etapas de processamento pelas quais a oleaginosa é submetida a fim de se obter seus principais produtos. A partir da etapa de preparação, toda biomassa gerada como subproduto dos processos é considerada como resíduo agroindustrial.

FIGURA 1.3 - Etapas simplificadas de processamento de soja para obtenção de grãos, farelo e óleo.



Fonte: Adaptado de DE PRETTO *et al.*, 2018.

O principal resíduo agroindustrial da soja é a palha, seguido da vagem da planta. Ambas têm sua maior parte separadas logo na etapa de colheita

e, em geral, são deixadas no solo para o preparo de uma nova cultura (STRIEDER e BERTAGNOLLI, 2016). O passo seguinte do processamento consiste na pré-limpeza e limpeza dos grãos feita na usina de processamento de maneira a retirar os resíduos que persistiram do processo anterior – é nessa biomassa que o presente estudo se concentra. Em sequência, ocorre a retirada das cascas e obtenção dos flocos de soja que serão submetidos à extração com solvente, sendo o hexano a escolha mais comum. Após essa etapa, as partes sólida e líquida são separadas e o solvente é evaporado de ambas, obtendo-se o farelo e o óleo cru. Este último deverá continuar na cadeia de processamento por mais etapas de forma a ser transformado no óleo de soja refinado (DE PRETTO *et al.*, 2018).

Estimativas acerca da razão entre a massa de resíduos e a de grãos colhidos devem levar em consideração as técnicas de cultivo, fertilidade do solo, as condições climáticas e as formas de processamento. Esse fator, para a produção dos grãos da oleaginosa em questão, é próximo a 2, conforme os diferentes estudos citados por ARAÚJO *et al.* (2019), o que significa que para cada tonelada de grãos, o dobro é gerado em resíduos. A biomassa obtida pelas etapas prévias do processamento na indústria é destinada à incorporação em ração animal, o que pode ser considerado um fim não nobre, visto que os compostos presentes nesse material podem representar a geração de um valor 7,5 vezes maior para esta cadeia de produção (PFALTZGRAFF *et al.*, 2013).

1.3 - Biorrefinaria e economia circular

Para a extração dos compostos bioativos dos resíduos agroindustriais, o conceito de biorrefinaria pode ser aplicado. Este consiste na utilização de qualquer biomassa como matéria-prima para geração de diferentes substâncias com alto valor agregado propícias para indústria química, de materiais e de combustíveis (FORSTER-CARNEIRO *et al.*, 2013).

É importante ressaltar que o alto custo relacionado ao processamento, à complexidade dos processos e à baixa conversão de biomassa em produtos são algumas das barreiras que cerceiam a biorrefinaria (ATTARD *et al.*, 2020). A fim de transpô-las, são necessárias avaliações acerca da escalabilidade dos procedimentos empregados para o nível industrial, dos benefícios e impactos ao meio ambiente por eles causados, da disponibilidade da então considerada matéria-prima e do seu potencial econômico e tecnológico (CALDEIRA *et al.*, 2020).

Uma complementação considerada proveitosa para a biorrefinaria seria a implementação da economia circular. Esta pauta processos que inserem os resíduos de processamento e de consumo novamente na linha de produção, constituindo assim uma nova fonte de matéria-prima e, dessa maneira, reduzindo a exploração intensa dos recursos naturais do planeta. Combinar esses dois conceitos exige modificar relações de consumo e mesmo o formato das linhas de produção – que no novo modelo passariam a ser círculos de produção (KÜMMERER *et al.*, 2020). Assim, todo material utilizado em processamentos seria melhor aproveitado.

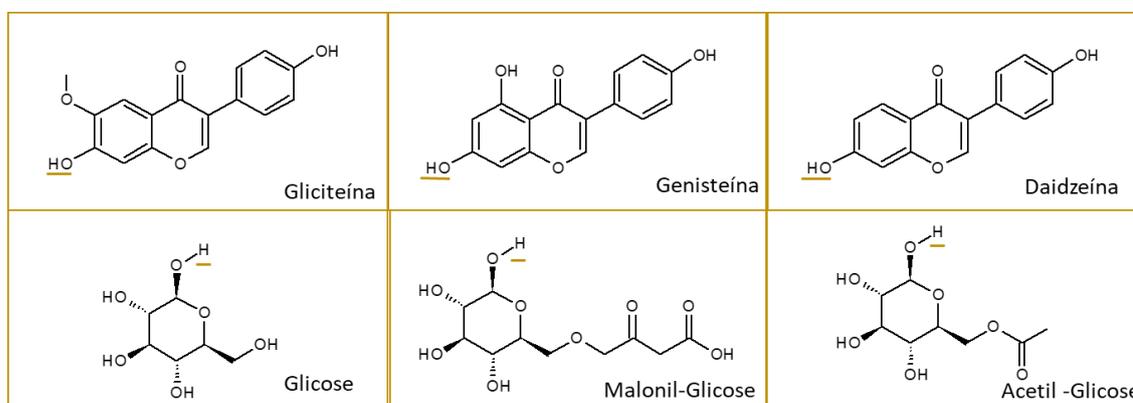
Através da biorrefinaria e da economia circular aplicadas aos resíduos agroindustriais, cascas de batata se tornam fontes de antioxidantes e de compostos relevantes como o hidroximetilfurfural e biocarvão (EBIKADE *et al.*, 2020); resíduos de laranja geram combustíveis, solventes alternativos e pectina (JIMÉNEZ-CASTRO *et al.*, 2020); e sementes de manga originam compostos fenólicos (ZUIN *et al.*, 2020a). No que diz respeito à cadeia de produção do complexo soja, produtos como biodiesel, glicerol, vitamina E, lecitina, saponinas e isoflavonas podem ser obtidos através da implementação da biorrefinaria (PESSOA *et al.*, 2019).

1.4 - Isoflavonas encontradas na soja e sua relevância

Uma das classes de compostos que apresenta potencial para o conceito de biorrefinaria é a dos flavonoides. Estes consistem em um grupo de metabólitos secundários de vegetais de baixo peso molecular que são pertencentes à classe de polifenóis (KŘÍŽOVÁ *et al.*, 2019). Um conjunto dessas moléculas chamadas de isoflavonas está presente na soja, e por isso se tornou o foco deste estudo.

As principais isoflavonas que figuram no metabolismo da oleaginosa são derivadas da gliciteína, da daidzeína (DAI) e da genisteína (GEN). Essas três moléculas podem ocorrer na forma livre (agliconas) ou na forma conjugada com açúcares, formando, assim, doze fito-hormônios distintos relacionados à soja (ZAHEER e AKHTAR, 2017). As estruturas das isoflavonas e os grupos que com elas formam conjugados são mostrados na *FIGURA 1.4*.

FIGURA 1.4 - Estrutura das isoflavonas e de grupos que com elas conjugam.



*Os β -glucosídeos são constituídos pela ligação entre as posições sublinhadas nas isoflavonas e na glicose e seus derivados, através de desidratação.

Fonte: Elaboração própria.

Essas moléculas têm importância nas interações planta-microbiota, sendo produzidas em defesa durante o estresse vegetal (por exemplo, baixa umidade e/ou ataque de patógenos) ou ainda como precursoras de outras moléculas com atividade antimicrobiana. Além disso, elas possuem papel na

nodulação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio. A concentração de isoflavonas na soja também depende da temperatura, fertilidade do solo, processamento pós-colheita, dentre outros fatores (GOULD e LISTER, 2006; KŘÍŽOVÁ *et al.*, 2019).

Esse grupo de substâncias apresenta estrutura muito similar à de hormônios relacionados ao sistema reprodutor em mamíferos e, por isso, apresenta atividade biológica em humanos (PABICH e MATERSKA, 2019). Como evidenciado por HIGDON e colaboradores (2016), inúmeros estudos tentam verificar a importância dessas substâncias na prevenção e tratamento de condições como os cânceres relacionados ao sistema reprodutor, a osteoporose, as doenças cardiovasculares, dentre outras. Ocorre que essas pesquisas ainda são preliminares quanto aos benefícios (e mesmo malefícios) dos referidos compostos à saúde humana.

Estima-se que 60% das isoflavonas existentes em *Glycine max* (L.) Merr. sejam GEN e derivados, e que DAI e seus glicosídeos representem 35% (ZAHEER e AKHTAR, 2017). Em humanos, esses metabolitos só apresentam bioatividade quando em sua forma livre, sendo necessária a presença de bactérias na flora intestinal capazes de hidrolisar as formas conjugadas (PABICH e MATERSKA, 2019).

Por último, o mercado de isoflavonas, tendo como seu principal produto aquelas provenientes da soja, teve valor estimado em US\$ 1,1 bilhão em 2019 com prospecto de crescimento até 2025 (ISOFLAVONES..., 2019). Dentre seus usos de maior interesse figuram a produção de fármacos, nutracêuticos, cosméticos e alimentos funcionais. Estes últimos são alimentos que possuem constituintes com função metabólica no crescimento, desenvolvimento e manutenção do corpo humano (ANVISA, 1999). Por conta disso, a extração desses componentes de biomassa residual de processamento – uma fonte que não compete com a cadeia de produção comercial já estabelecida da soja – se torna um atrativo também ao setor industrial.

1.5 - Química verde e sustentável

A biorrefinaria dos resíduos de soja é tida como solução ao problema do desperdício. Entretanto, apenas esse conceito não é garantia de que a biomassa será devidamente aproveitada. Para que haja coesão com os temas já citados, também se faz necessária a atenção com o desperdício dentro dos processos de extração, purificação, recuperação e outros tantos relacionados à extração de compostos bioativos dos resíduos agroindustriais de soja. Portanto, adotar a perspectiva oferecida pela química verde e também pela química sustentável se mostra importante aos objetivos da biorrefinaria.

A química verde é uma filosofia dentro das ciências que visa criar produtos e processos no âmbito da química que não sejam deletérios ao meio ambiente e a saúde humana (LENARDÃO *et al.*, 2003). Essa corrente teórica se desdobrou em doze princípios, criados por Paul Anastas e John Warner nos anos 1990, que ainda são amplamente utilizados nos dias de hoje. A intenção dos princípios é evitar o agravamento dos problemas ambientais pela prática consciente, buscando preveni-los em vez de tentar retificá-los. A redução do uso de energia, de solventes tóxicos e de substâncias auxiliares e a adoção de rotas sintéticas mais limpas, com uso de catalisadores, por exemplo, são algumas das proposições encontradas nesses princípios (CORRÊA e ZUIN, 2012).

A química sustentável contém a química verde, mas não se encerra apenas nela. Enquanto esta se preocupa com o que é adotado dentro dos laboratórios, aquela direciona o olhar também aos procedimentos anteriores e posteriores, pensando na função do que é produzido e para quem (KÜMMERER, 2017). Em suma, a química sustentável engloba as esferas social (de trabalho e de consumo) e econômica do “fazer química”, buscando orientar-se pela sustentabilidade, ou seja, manter as condições de um viver pleno e integrado ao ambiente de forma a garantir também essa possibilidade às gerações vindouras (CLARK, 2016). Portanto, a química sustentável se implementa também pela

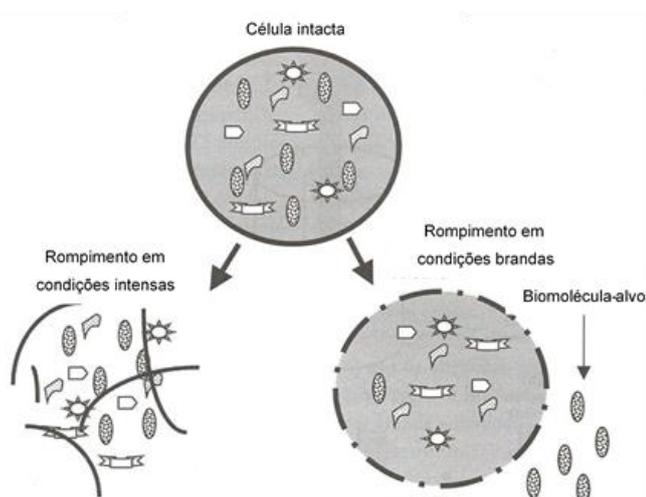
biorrefinaria e pela circularidade, desde que direcionadas para práticas mais limpas e eficientes, como será descrito nos tópicos seguintes.

1.5.1 - Métodos de extração

O preparo de amostras é a questão central ao trazer a química sustentável para o âmbito da química analítica, pois esta etapa consome de 60% a 80% dos recursos aplicados na análise, e também é a fonte primária de erros (ZUIN, 2016). No contexto deste trabalho, o preparo de amostras concerne majoritariamente o estágio de extração de isoflavonas da biomassa residual de soja. Portanto, compreender como ocorrem as extrações é crucial para optar por técnicas mais limpas e eficientes.

A etapa essencial para que a extração de compostos de matrizes vegetais ocorra de maneira satisfatória é a ruptura das células da planta, mais especificamente da membrana celular e da parede celular, pois, assim, o conteúdo intracelular é liberado para o meio de extração (ISLAM *et al.*, 2017). A FIGURA 1.5 esquematiza o efeito do rompimento das células em condições brandas ou mais intensas.

FIGURA 1.5 - Esquema comparativo das condições de rompimento de células.



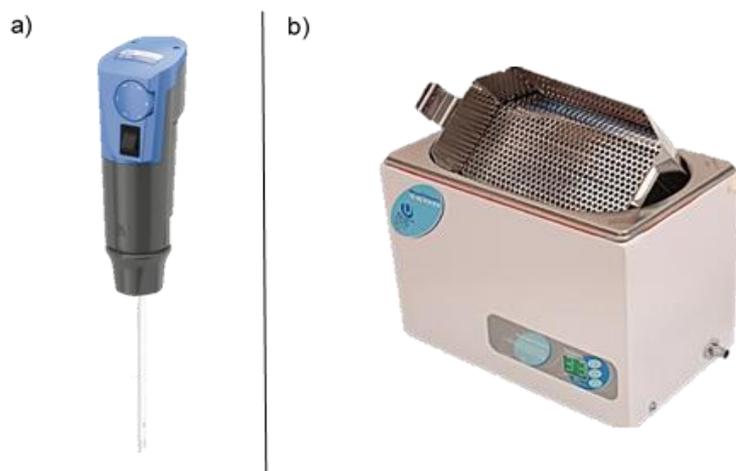
Fonte: Adaptado de CARVALHAL, 2016.

Os métodos convencionalmente aplicados são baseados em extração sólido-líquido, que em geral se utilizam de solventes orgânicos voláteis que interagem quimicamente com as organelas supracitadas, rompendo-as (ISLAM *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2018a). Como a difusão do solvente pela amostra pode ser lenta, partículas de biomassa com maior área superficial são preferidas (ZHANG *et al.*, 2018a). Para acelerar a difusão, também é comum a realização dos experimentos de extração em temperaturas maiores que a ambiente.

Em busca de alinhar o procedimento de extração à química verde é necessário encontrar outros meios de romper a parede e a membrana celular que não utilizem reagentes tóxicos, mas também facilitem a difusão do solvente pela biomassa de maneira eficiente com relação ao gasto energético, além de não alterarem a estrutura dos compostos intracelulares, permitindo também sua solvatação sem obstáculos. Atendendo a este quesito, inúmeras técnicas podem ser citadas, como a extração assistida por ultrassom (EAU), a extração assistida por micro-ondas, a extração assistida por enzimas, a extração assistida por homogeneizador de alta velocidade (EAH), a extração por campo elétrico pulsado, as diferentes extrações em fase sólida, as extrações miniaturizadas e as extrações com uso de solventes alternativos, como os líquidos iônicos, os fluídos subcríticos e supercríticos e os solventes eutéticos profundos (ZHANG *et al.*, 2018a; ZUIN, 2016).

Dentre as técnicas citadas, é necessário escolher para corresponder aos objetivos da biorrefinaria e da química sustentável aquelas que se apresentam como escalonáveis em nível industrial. Assim, destaca-se a extração assistida por ultrassom e a extração assistida por homogeneizador de alta velocidade, pois ambas impõem o rompimento celular sob condições intensas. Os equipamentos referentes à estas técnicas estão expostas na *FIGURA 1.6*.

FIGURA 1.6 - Equipamentos utilizados para extração: a) homogeneizador de alta velocidade; b) banho ultrassônico.



Fonte: a) IKA, 2021; b) UNIQUE, 2021.

1.5.1.1 - Extração assistida por ultrassom

A EAU consiste na utilização de ondas mecânicas para o rompimento da parede e da membrana celular. O fenômeno ocorre pela indução de ondas sonoras com frequências de 20 kHz até 10 MHz, que criam no solvente extrator regiões de compressão e rarefação, ciclicamente, gerando com isso bolhas de cavitação. A cada ciclo, essas bolhas engrandecem até um ponto crítico, onde colapsam gerando uma onda de choque localizada, de alta pressão e temperatura. As moléculas próximas são arremessadas em alta velocidade e, eventualmente, colidem com as células, causando seus rompimentos (PICÓ, 2013; SORIA e VILLAMIEL, 2010). Devido ao fato de o equipamento – o banho ultrassônico – ser de simples operação e facilmente escalonável, é uma técnica promissora para a química verde e sustentável. Porém, a baixa seletividade e eficiência de ruptura celular – visto que a cavitação ocorre aleatoriamente dentro do meio reacional – são obstáculos para sua implementação (AMORIM *et al.*, 2020). A extração de isoflavonas oriundas de sementes de soja por esse procedimento é tratada em alguns estudos (DUROVIC *et al.*, 2018; LANTE *et al.*, 2018).

1.5.1.2 - Extração assistida por homogeneizador de alta velocidade

A extração assistida por homogeneizador também ocorre por meio do fenômeno de cavitação, em conjunto com a força de cisalhamento que as células são submetidas. Após a submersão do rotor de aço inoxidável do equipamento utilizado neste procedimento no meio extrator, a rotação dessa peça gera queda na pressão nas suas proximidades, de maneira a provocar a formação de bolhas de cavitação que, ao se afastarem da ponta do rotor, terminam por colapsar, criando situação análoga à descrita no tópico anterior (*SEÇÃO 1.5.1.1*).

Além disso, a alta velocidade de rotação (maior que 8500 rpm) também é responsável por causar o cisalhamento das células (GOGATE e PANDIT, 2008; GÜNERKEN *et al.*, 2015). Essa técnica, assim como a que utiliza o banho ultrassônico, apresenta um equipamento de simples manuseio. A ruptura das células é bastante efetiva, mas apresenta condições experimentais severas (temperatura e pressão), o que pode prejudicar a extração de moléculas lábeis. O consumo elevado de energia pode ser compensado pela rapidez do procedimento (AMORIM *et al.*, 2020; GÜNERKEN *et al.*, 2015). Ainda, mesmo que escalonável, apresenta dificuldades práticas para que isso se efetue. O autor desconhece trabalhos que tratem do uso dessa técnica para extração de isoflavonas da soja; entretanto, essa técnica foi estudada para extração de compostos fenólicos de resíduos de maçãs (ZHANG *et al.*, 2018b), laranja (ZUIN *et al.*, 2020a), manga (ZUIN *et al.*, 2020b) e maracujá (FRANCISCHINI *et al.*, 2020).

1.5.2 - Planejamento de experimentos

A quimiometria consiste em uma ampla gama de ferramentas estatísticas e matemáticas que permite otimizar os resultados dos experimentos ao avaliar simultaneamente os parâmetros que afetam as extrações, de maneira a reduzir ao máximo o número de experimentos necessários e, portanto, economizando os recursos utilizados na extração e o tempo da pesquisa, sendo,

assim, crucial nos estudos em química verde e sustentável (PEREIRA-FILHO, 2016).

Primeiramente, é necessário selecionar as variáveis a serem estudadas. O planejamento fatorial completo (PFC), por exemplo, necessita de 2^n experimentos, sendo n o número que representa a quantidade de variáveis. É esse planejamento que permite avaliar a importância de cada variável para que se atinja o objetivo de um experimento. As variáveis devem ser quantitativas e testadas em dois valores diferentes, nomeados como níveis, comumente simbolizados como -1 e $+1$, em uma série sistemática de experimentos únicos (PEREIRA-FILHO, 2016; TEÓFILO e FERREIRA, 2006) que devem ser realizados como representado pela *TABELA 1.1*.

TABELA 1.1 - Exemplo de planejamento fatorial completo para duas variáveis.

Experimento	Nível da variável	
	Variável 1 (V_1)	Variável 2 (V_2)
1	+1	+1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	-1	-1

Fonte: Elaboração própria.

Através dos resultados é possível calcular os efeitos de cada variável subtraindo a média dos resultados dos experimentos no nível -1 da média dos resultados dos experimentos no nível $+1$. Importante ressaltar que nessa primeira etapa o ponto central não é previsto, bem como duplicatas. Isso advém do fato de que, com a exclusão de variáveis, é possível encontrar duplicatas teóricas que permitem cálculos estatísticos.

Quando o número de variáveis é grande, o número de experimentos acaba sendo inviável. Nessa situação, pode-se optar pela utilização do planejamento fatorial fracionário (PFF) com 2^{n-1} experimentos, que segue a

mesma distribuição da tabela anterior, com o adendo que a última variável tem seu nível como sendo a multiplicação dos níveis das outras variáveis estudadas. O cálculo de efeitos é análogo, sendo necessário lembrar que, por ter um menor número de experimentos, os efeitos das variáveis se mesclam, tornando o estudo menos preciso que o PFC (PEREIRA-FILHO, 2016; TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

A partir do conhecimento das variáveis mais influentes no resultado objetivado, o estudo quimiométrico visando a criação de modelos matemáticos para otimização dos resultados é requerido. Assim, as variáveis selecionadas pelo planejamento fatorial ou fatorial fracionário devem ser analisadas por um planejamento que permita a utilização de mais que dois níveis. Dependendo da especificidade de cada técnica, diferentes planejamentos podem ser utilizados. O planejamento composto central (PCC) é muito similar ao planejamento fatorial, adicionando-se os níveis $+2^{k/4}$ e $-2^{k/4}$ (tidos como axiais) e o nível 0 (ponto central) (PEREIRA-FILHO, 2016; TEÓFILO e FERREIRA, 2006). A TABELA 1.2 mostra um exemplo de aplicação desse planejamento.

TABELA 1.2 - Exemplo de planejamento composto central para duas variáveis.

Experimento	Variável normalizada	
	V ₁	V ₂
1	$-\sqrt{2}$	0
2	$\sqrt{2}$	0
3	0	$-\sqrt{2}$
4	0	$\sqrt{2}$
5	1	-1
6	1	1
7	-1	1
8	-1	-1
9	0	0

Fonte: Elaboração própria.

O experimento com todas as variáveis no ponto central é feito em triplicada para o cálculo do desvio padrão dos experimentos. A partir dos resultados é necessária a aplicação de cálculos matriciais complexos para elaboração de um modelo de regressão capaz de prever resultados de experimentos. Apesar disso, *softwares* podem ser programados para rápida execução destes cálculos, fomentando, assim, as decisões a serem tomadas para um melhor rendimento de extração (PEREIRA-FILHO, 2016; TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

1.5.3 - Métricas

Os princípios da química verde são diretrizes qualitativas para um trabalho ambientalmente benigno, o que torna sua aplicação e discussão, por vezes, subjetiva. Para que se possa comparar diferentes experimentos quanto ao seu grau verde, métricas quantitativas se fazem necessárias e ajudam na seleção consciente de técnicas mais limpas (ZUIN, 2016). Existem métricas relacionadas com os processos dentro do laboratório, como “fator E” e “economia atômica” (SHELDON, 2018); métricas relacionadas ao ensino de química (PESSOA *et al.*, 2019), exemplificadas pela “estrela verde” (RIBEIRO *et al.*, 2010), pela “rosa dos ventos da educação em química verde sustentável” (ZUIN *et al.*, 2019), e por muitas outras. Dentre estas, destaca-se para a química verde sustentável uma métrica denominada análise de ciclo de vida, uma abordagem holística que avalia um produto do seu “berço” ao “túmulo” (*cradle to grave*). Nela, o consumo de recursos para produção e transporte, a poluição gerada no processamento e seus impactos ambientais são agregados para designar quanto determinada técnica segue os critérios de sustentabilidade (SHELDON, 2018; ZUIN, 2016).

Mesmo sendo uma métrica robusta, a grande quantidade de dados necessários para a sua aplicação pode torná-la difícil de concretizar. Pensando nisso, FRANCISCHINI e colaboradores (2020) sugeriram um meio de analisar o

consumo de recursos de forma comparativa para extrações, denominada fatores sustentáveis (FS). Estes consistem em razões entre a massa de compostos extraídos pela quantidade de recursos (volume de solvente, tempo, energia ou massa de amostra) que foram empregados na extração. Essa métrica permite também um novo olhar para otimização de resultados, já que os melhores rendimentos de extração não implicam nos valores mais baixos de consumo de recursos e, portanto, permite a análise simplificada de um quesito importante para os almejados processos sustentáveis.

1.5.4 - Análise

A etapa de análise também deve seguir os preceitos da química verde e sustentável. Para tanto, métodos analíticos benignos devem ser investigados quanto às suas condições e consumo de recursos. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica bastante tradicional na pesquisa sobre produtos naturais, entretanto, dispendiosa em relação ao tempo de análise e volume de solvente (GAMA *et al.*, 2019). Uma alternativa a ela é a adoção da cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), que segue os mesmos preceitos da anterior, porém conta com equipamentos que suportam pressões acima de 100 Mpa (MALDANER e JARDIM, 2009), o que a torna mais rápida e eficiente ao passo que necessita de menor quantidade de amostra e solvente (CIELECKA-PIONTEK *et al.*, 2013). Além disso, o uso de solventes menos nocivos para constituição da fase móvel, como metanol ou etanol em vez de acetonitrila, é desejável para a química sustentável (GAMA *et al.*, 2019)

Tanto a CLAE quanto a CLUE são utilizadas para investigação de isoflavonas de soja em diversos tipos de amostra, como as variantes para produção de edamame (WU *et al.*, 2004), para produção de tofu (SHEN *et al.*, 2012) e grãos fermentados de soja e leite de soja (LEE *et al.*, 2015), mostrando, assim, que essa

técnica é amplamente utilizada na literatura para análise de metabolitos secundários.

2 - Objetivos

Este tópico tratará dos objetivos gerais e específicos desta dissertação.

2.1 - Objetivo geral

Esta pesquisa tem como objetivo demonstrar a potencialidade do resíduo agroindustrial da cadeia de produção e processamento da soja como fonte relevante de compostos bioativos. O estudo também busca o desenvolvimento de métodos analíticos verdes e sustentáveis de extração dessas substâncias – mais especificamente isoflavonas – da biomassa residual de soja, com o intuito de agregar valor a esse subproduto, favorecendo a biorrefinaria e a economia circular.

2.2 - Objetivos específicos

- Utilizar duas técnicas de extração, a EAU e a EAH, e compará-las;
- Desenvolver e validar um método cromatográfico para análise dos extratos;
- Otimizar os experimentos quanto ao seu rendimento de extração utilizando ferramentas quimiométricas;
- Fazer uso de métricas para comparar os experimentos quanto ao rendimento de extração e aos recursos empregados (volume de solvente, tempo, energia, massa de amostra);
- Avaliar o resíduo agroindustrial de soja como fonte de isoflavonas.

3 - Metodologia

Nesta seção serão descritos os materiais utilizados na pesquisa, sua origem e também os métodos empregados para extração, quantificação e validação dos resultados, bem como os métodos estatísticos para seleção e otimização das variáveis e o cálculo da métrica empregada.

3.1 - Amostras e padrões

Esse tópico tratará das amostras e padrões analíticos empregados, bem como sua origem.

3.1.1 - Amostra, caracterização e condicionamento

Aproximadamente 300 g de amostra de resíduo agroindustrial de soja foram doados pela Cooperativa dos Plantadores de Cana do Estado de São Paulo (COPLACANA – Piracicaba, São Paulo), unidade de grãos, fábrica que armazena milho, soja e, também, é fabricante de farelo de soja semi-integral e óleo de soja bruto. A amostra consistiu no resíduo da etapa pré-limpeza da safra 2018 (fevereiro a maio). Nesta fase, os grãos colhidos passam por um sistema de mesa vibratória onde são separados de seus fragmentos (cascas, vagens e grãos quebrados). Estes foram coletados, submetidos à secagem a 200°C, moídos e peneirados (35 mesh, 420 µm) ainda nas dependências da empresa. O material, quando recebido, foi devidamente envasado em recipiente de vidro e condicionado em local abrigado de luz, umidade e calor. Uma fotografia da amostra antes e depois do processamento ainda na COPLACANA pode ser observada na *FIGURA 3.1*.

FIGURA 3.1 - Resíduo agroindustrial da pré-limpeza (esquerda) e o mesmo resíduo após a moagem e peneiração (direita).



Fonte: Fotografia por Renata Rossi (2019).

3.1.2 - Padrões analíticos

Os padrões analíticos de alta pureza (≥ 98) de genisteína e daidzeína foram obtidos da Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brasil).

3.2 - Planejamento experimental

O planejamento dos experimentos foi dividido em dois momentos, o primeiro consistindo nos planejamentos fatorial completo e fatorial fracionário para triagem das variáveis selecionadas, e o segundo na elaboração de modelos matemáticos para otimização dos experimentos quanto ao rendimento de extração. Para tanto, a resposta utilizada nos planejamentos foi o rendimento de extração dado em mg de analito por g de amostra (mg g^{-1}). Todos os planejamentos e cálculos foram realizados utilizando o *software* Microsoft Excel e o *software* Octave (versão 4.2.1).

3.2.1 - Triagem de variáveis

Esta seção descreve os procedimentos adotados para a triagem das variáveis nas duas técnicas de extração estudadas.

3.2.1.1 - Planejamento fatorial fracionário para extração assistida por homogeneizador de alta velocidade

Para a EAH foram escolhidas quatro variáveis: composição da solução usada como solvente extrator (em porcentagem de volume de etanol presente em dado volume da solução, v/v); tempo de extração; razão amostra-solvente (razão da massa de amostra pelo volume de solvente, m/v); e velocidade de rotação do equipamento. Como sugerido por TEÓFILO e FERREIRA (2006), o PFF pode ser aplicado quando o número de variáveis é alto, pois dessa maneira o número de experimentos pode ser minimizado sem grandes perdas nas informações geradas. Sendo assim, um planejamento de $2^{(4-1)}$ experimentos foi empregado, sendo o valor da variável “velocidade de rotação” dependente da interação das outras três variáveis. O valor real adotado para as variáveis, suas respectivas unidades de medida, o código adotado para elas (V_1, V_2, V_3, V_4), e a normalização dos níveis estudados (-1 e $+1$) são mostrados na *TABELA 3.1*. Os valores adotados para essas variáveis foram decididos através de trabalhos anteriores do grupo de pesquisa (Grupo de Estudo e Pesquisa em Química Verde, Sustentabilidade e Educação – GPQV) sobre análise de flavonoides e outros compostos polifenólicos em resíduos de frutas (FRANCISCHINI *et al.*, 2020; ZUIN *et al.*, 2020a).

TABELA 3.1 - Variáveis estudadas e valores adotados em nível máximo (+1) e mínimo (-1) para extração assistida por homogeneizador de alta velocidade.

Variável		V ₁ Composição do solvente (%EtOH/H ₂ O)	V ₂ Tempo (min.)	V ₃ Razão Amostra- Solvente (g mL ⁻¹)	V ₄ Velocidade de rotação (rpm)
Nível	+1	80	5	0,1	21.100
	-1	20	2	0,2	10.900

Fonte: Elaboração própria.

Com as condições mostradas, os experimentos foram realizados de acordo com o planejamento exposto na TABELA 3.2, em ordem aleatória.

TABELA 3.2 - Descrição codificada dos experimentos dada pelo planejamento fatorial fracionário para extração assistida por homogeneizador de alta velocidade.

Experimento	Variável normalizada			
	V ₁ Composição do solvente	V ₂ Tempo	V ₃ Razão Amostra- Solvente	V ₄ Velocidade de rotação
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

Fonte: Elaboração própria.

3.2.1.2 - Planejamento fatorial completo para extração assistida por ultrassom

Para a EAU selecionou-se três variáveis: frequência ultrassônica empregada na extração; tempo de extração; e composição do solvente extrator. O PFC descrito por PEREIRA-FILHO (2016) foi empregado com as quantidades

mostradas na *TABELA 3.3*, a qual também mostra as unidades das variáveis, sua codificação e o nível máximo e mínimo estudados. Essas quantias foram determinadas por meio do estudo dos resultados obtidos pela EAH.

TABELA 3.3 - Variáveis estudadas e valores adotados em nível máximo (+1) e mínimo (-1) para extração assistida por ultrassom.

Variável		V ₁ Frequência (kHz)	V ₂ Tempo (min.)	V ₃ Composição do solvente (%EtOH/H ₂ O)
Nível	+1	40	20	80
	-1	25	5	50

Fonte: Elaboração própria.

Com as condições expostas, o planejamento fatorial com oito experimentos, representado pela *TABELA 3.4* foi aplicado em ordenamento aleatório.

TABELA 3.4 - Descrição codificada dos experimentos dada pelo planejamento fatorial completo para extração assistida por ultrassom.

Experimento	Variável normalizada		
	V ₁ Frequência	V ₂ Tempo	V ₃ Composição do solvente
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

Fonte: Elaboração própria.

3.2.2 - Otimização dos experimentos

A otimização dos experimentos ocorreu através do PCC para ambas as técnicas. As particularidades em cada um dos procedimentos de extração serão descritas neste tópico.

3.2.2.1 - Planejamento composto central para extração assistida por homogeneizador de alta velocidade

Para esta etapa do trabalho, apenas as variáveis “razão amostra/solvente” e “composição do solvente extrator” foram analisadas, de acordo com os resultados do procedimento descrito no *TÓPICO 3.2.1.1*. Propôs-se um PCC com o objetivo de obter modelos matemáticos que descrevessem o experimento e as influências das variáveis selecionadas nas respostas. A *TABELA 3.5* mostra as variáveis, suas unidades, sua codificação e os níveis adotados para elas para essa etapa. Para determinar as concentrações utilizadas no PCC, os resultados do planejamento fatorial foram ponderados, com o nível 0 possuindo valor real próximo ao do melhor experimento do PFF.

TABELA 3.5 - Variáveis estudadas e valores adotados nos cinco diferentes níveis para extração assistida por homogeneizador de alta velocidade.

Variável		V ₁ Razão Amostra- Solvente	V ₂ Composição do solvente
Nível	$-\sqrt{2}$	0,05	50
	-1	0,065	56
	0	0,1	70
	1	0,135	84
	$\sqrt{2}$	0,15	90

Fonte: Elaboração própria.

O PCC, neste caso, segundo PEREIRA-FILHO (2016), segue a mesma disposição apresentada na *TABELA 1.2*. O ponto central (experimento 9) foi feito em triplicata para estimativa de desvio padrão e outros parâmetros importantes para o tratamento de dados, o que será abordado subsequentemente.

3.2.2.2 - Planejamento composto central para extração assistida por ultrassom

Três variáveis foram selecionadas para otimização da técnica que se utiliza do banho ultrassônico: tempo; composição do solvente extrator; e razão amostra-solvente. Os níveis determinados para o estudo, bem como os valores reais para cada variável, podem ser observados na *TABELA 3.6*. Para determinar as concentrações utilizadas no PCC, os resultados do planejamento fatorial foram ponderados tendo o ponto central (nível 0) valor real próximo aos dos melhores experimentos no PFC. Importante notar que 1,68 é o valor aproximado de $2^{3/4}$, e foi utilizado nas tabelas por maior praticidade na formatação e nos cálculos.

TABELA 3.6 - Variáveis estudadas e valores adotados nos cinco diferentes níveis para extração assistida por ultrassom.

Variável		V ₁ Razão Amostra-Solvente (g mL ⁻¹)	V ₂ Tempo (min)	V ₃ Composição do solvente (%EtOH/H ₂ O)
Nível	-1,68	0,05	2	60
	-1	0,07	3,62	66
	0	0,10	6	75
	1	0,13	8,4	84
	1,68	0,15	10	90

Fonte: Elaboração própria.

O planejamento adotado está representado pela *TABELA 3.7*, contando com 15 experimentos.

TABELA 3.7 - Descrição codificada dos experimentos dada pelo planejamento de composto central para extração assistida por ultrassom.

Experimento	Variável normalizada		
	V ₁ Razão Amostra- Solvente	V ₂ Tempo	V ₃ Composição do solvente
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	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0

Fonte: Elaboração própria.

3.3 - Extrações

Neste tópico serão descritos ambos os métodos de extrações empregados: extração assistida por homogeneizador de alta velocidade; e extração assistida por ultrassom.

3.3.1 - Extração assistida por homogeneizador de alta velocidade

Os experimentos de extração apresentados a seguir foram realizados com base nos estudos de RAMIN e colaboradores (2017) sobre extração de polifenólicos de resíduos industriais.

3.3.1.1 - Planejamento fatorial fracionário para extração assistida por homogeneizador de alta velocidade

O procedimento de extração foi realizado da seguinte forma: tubos falcon (15 mL) foram enumerados de 1 a 8, correspondentes a cada um dos experimentos no planejamento. Em cada um destes, 0,5 g de amostra foram inseridos após pesagem em balança semianalítica. Então, sorteou-se aleatoriamente uma ordem para os experimentos. Na sequência conscrita, um por vez, adicionou-se aos tubos volumes de etanol de pureza analítica (Grau CLAE, Panrec[®], Barcelona, Espanha) e água ultrapura grau 1 (Sistema de ultrapurificação MiliQ, Milipore[®], Burlington, Estados Unidos), de maneira a atingir a composição etanólica do solvente extrator requerida pelo planejamento (20% ou 80%). O volume total do solvente adicionado foi de 2,5 mL ou 5,0 mL, a depender do respectivo experimento. Em sequência, o conjunto foi submetido ao homogeneizador de alta velocidade (Ultra-Turrax[®], IKA, T10 basic, Staufen im Breisgau, Alemanha) por um determinado tempo (2 ou 5 min) e à velocidade de rotação específica (10.900 ou 21.100 rpm). A solução resultante foi submetida à centrifugação (Eppendorf centrifuge 5810 R) nas seguintes condições: 10°C, 10 min e 10.000 rpm. O sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta de Pasteur e filtrado em uma membrana de politetrafluoretileno (PTFE, 0,45 µm) para posterior análise no sistema cromatográfico.

3.3.1.2 - Planejamento composto central para extração assistida por homogeneizador de alta velocidade

O procedimento de extração foi realizado da seguinte forma: tubos falcon (15 mL) foram enumerados de 1 a 9, correspondentes a cada um dos experimentos no planejamento. A biomassa residual foi pesada (0,125 g - 0,375 g). Então, sorteou-se aleatoriamente a ordem para os experimentos. Na sequência

conscrita, um por vez, adicionou-se aos tubos volumes de etanol e água ultrapura suficientes para completar 2,5 mL e de maneira a atingir a composição etanólica do solvente extrator requerida, entre 50% e 90%. Em sequência, o conjunto foi submetido ao homogeneizador de alta velocidade por 3 min com velocidade de rotação de 14.500 rpm. A solução resultante foi submetida à centrifugação (10°C, 10 min, 10.000 rpm). O sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta de Pasteur e filtrado em uma membrana de PTFE (0,45 µm) para posterior análise no sistema cromatográfico.

3.3.2 - Extração assistida por ultrassom

A EAU foi estudada de maneira semelhante para ambos os planejamentos. As decisões tomadas quanto às variáveis são fruto da racionalização dos resultados da EAH. Detalhamentos dos procedimentos para extração serão discutidos nesta seção.

3.3.2.1 - Planejamento fatorial completo para a extração assistida por ultrassom

As extrações foram realizadas da seguinte forma: frascos de vidro do tipo *vial* (5 mL) com tampas foram enumerados de 1 a 8. Em cada um deles foi inserido 0,5 grama de amostra, devidamente pesada em balança semianalítica (Shimadzu AY220, São Vicente, Brasil). Foram adicionados aos frascos volumes de água ultrapura e etanol suficientes para totalizarem 5 mL de solvente extrator, de maneira a obter concentração etanólica (50% ou 80%). Os recipientes foram fechados e submetidos ao banho ultrassônico (Maxiclean 1450, UNIQUE, Indaiatuba, Brasil) em determinada frequência (25 ou 40 kHz), pelo tempo de 5

ou 20 min¹. Os produtos desse procedimento foram transferidos para tubos Falcon e centrifugados (10°C, 10 min, 10.000 rpm). O sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta de Pasteur e filtrado por membrana PTFE (0,45 µm) para posterior análise no sistema cromatográfico.

3.3.2.2 - Planejamento composto central para extração assistida por ultrassom

As extrações foram empregadas da seguinte forma: frascos de vidro do tipo *vial* (5 mL) com tampas foram enumerados de 1 a 17. Em cada um deles foi inserido uma quantidade de amostra definida (0,25 g - 0,75 g), devidamente pesada em balança semianalítica. Foram adicionados aos frascos volumes de água ultrapura e etanol suficientes para totalizarem 5 mL de solvente extrator, de maneira a obter concentração etanólica previamente determinada (60% - 90%). Os recipientes foram fechados e submetidos ao banho ultrassônico em frequência de 40 kHz por um tempo específico de cada extração (2 min - 10 min)². Os produtos desse procedimento foram transferidos para tubos Falcon e centrifugados (10°C, 10 min, 10.000 rpm). O sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta de Pasteur e filtrado por membrana de PTFE (0,45 µm) para posterior análise no sistema cromatográfico.

3.4 - Método cromatográfico

O método cromatográfico foi desenvolvido no cromatógrafo de ultra eficiência Acquity H-Class UPLC®. Pelo extrato se tratar de uma matriz complexa, escolheu-se o modo gradiente para operação do equipamento.

¹ Os experimentos que compartilhavam as mesmas condições de tempo e frequência ultrassônica puderam ser realizados aos pares.

² Os experimentos com o mesmo tempo de extração foram feitos em simultâneo.

Pensando na estrutura das moléculas, sua polaridade e possíveis interações com as colunas cromatográficas, o modo reverso de eluição foi adotado. Para otimização, seguiu-se os passos descritos por CASS e DEGANI (2012), que consistem na utilização de um gradiente amplo (5% - 100% do solvente orgânico) e no posterior ajuste no tempo de eluição com base nos resultados desse gradiente. Para o estudo, acetonitrila, metanol (grau HPLC, Honeywell, Charlotte, Carolina do Norte, Estados Unidos), água ultrapura e água ultrapura acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (pureza ≥ 95 , Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foram os solventes adotados para fase móvel, enquanto, no que concerne às fases estacionárias, duas colunas cromatográficas foram empregadas: Acquity HSS C18 (Waters, tamanho de partícula de 1,8 μm ; 2,1 x 100 mm); e Acquity BEH C8, (Waters, tamanho de partícula de 1,7 μm ; 2,1 x 50 mm). A aquisição do cromatograma foi realizada através de um cromatógrafo do tipo CLUE (ACQUITY H-Class UPLC[®], Waters, Milford, Estados Unidos) e um detector de arranjo de diodos funcional nos comprimentos de onda da luz na faixa ultravioleta e visível. Os cromatogramas analisados foram realizados utilizando a absorção em 254 nm e computados através do *software* EMPOWER. O fluxo utilizado variou entre 0,3 mL min⁻¹ e 0,4 mL min⁻¹. A temperatura da coluna foi de 35 °C e o volume de injeção de amostra foi 1 μL .

3.5 - Método de quantificação

A fim de quantificar os analitos estudados na amostra, o método da curva analítica foi utilizado. Esta foi obtida através da aquisição das áreas de picos de padrões analíticos dos compostos estudados. Duas curvas analíticas foram construídas: uma apenas com soluções metanólicas dos analitos (curva no solvente); e outra com a adição dessas soluções dos analitos em um extrato etanólico de resíduo de soja (curva de adição de padrão, comumente, curva na matriz) obtido em condições semelhantes ao experimento 2 do PFF para EAH.

Esse procedimento é relevante para calcular se há efeito matriz e, com isso, determinar qual das duas curvas deverá ser selecionada para a quantificação, o que será melhor descrito posteriormente.

Cinco concentrações foram selecionadas, baseadas em testes cromatográficos anteriores com soluções-padrão (feitas com os analitos em metanol puro) e com extrato, e serviram como pontos para construção das curvas. Essas concentrações selecionadas podem ser vistas na *TABELA 3.8* e na *TABELA 3.9*. Através da curva construída, buscou-se correlacionar a concentração dos analitos (mg L^{-1}) com a área dos picos cromatográficos correspondentes a eles. Essa correlação foi obtida através dos fatores de inclinação e o intercepto da reta³, calculados pelo *software* da Microsoft, Excel 2019, através das funções “=INCLINAÇÃO(abcissas conhecidas; ordenadas conhecidas)” e “=INTERCEPÇÃO(abcissas conhecidas; ordenadas conhecidas)”. Além disso, a função de construção de gráficos do *software* foi utilizada para visualização dos dados obtidos, a qual utiliza o método de regressão linear dos mínimos quadrados.

TABELA 3.8 - Pontos teóricos da curva analítica e respectivas concentrações para a curva com analitos no solvente.

Ponto	Concentração (mg L^{-1})	
	Daidzeína	Genisteína
1	1	1
2	5	5
3	10	10
4	26	26
5	50	50

Fonte: Elaboração própria.

³ Em uma reta $y = ax + b$, “a” é o fator de inclinação e “b” o intercepto.

TABELA 3.9 - Pontos teóricos da curva analítica e respectivas concentrações para a curva com analitos na presença da matriz.

Ponto	Concentração (mg L ⁻¹)	
	Daidzeína	Genisteína
0	0	0
1	1	1
2	5	5
3	10	10
4	15	15
5	50	50

Fonte: Elaboração própria.

Para o procedimento, a solução padrão dos analitos foi confeccionada pela pesagem de 1 mg de GEN e de DAI em um mesmo frasco, e posterior adição de 2 mL de metanol (nesta etapa considerou-se que a variação de volume pelos analitos é desprezível). Após solubilização, uma alíquota de 0,4 mL da solução-padrão foi diluída pela adição de 1,6 mL de metanol (concentração de analitos igual a 100 mg L⁻¹). Esta nova solução foi designada como solução de trabalho, e utilizada na construção da curva. Com isso, alíquotas da solução de trabalho foram inseridas em diferentes frascos e diluídas com metanol para atingir as concentrações delimitadas para a curva dos analitos no solvente ou misturadas com o extrato e diluídas com metanol para atingir as concentrações necessárias para a curva na matriz. Todos os pontos confeccionados por esse procedimento foram feitos em triplicata, tendo cada um deles volume de 0,5 mL ao final das adições.

3.6 - Critérios de validação do método analítico

Para validação do método analítico, algumas figuras de mérito definidas pelo Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos

para Medicamentos de Uso Humano (ICH) (ICH, 2005) foram utilizadas, sendo elas: a linearidade; a seletividade; e um ensaio preliminar de recuperação. Ainda, estimou-se o limite de detecção e o limite de quantificação das curvas analíticas. Outros testes necessários, como de repetibilidade e precisão intermediária, também são previstos para quantificação, porém não foram realizados por conta da situação de saúde pública no Brasil (pandemia de COVID-19).

3.6.1 - Linearidade

A linearidade, por ser uma figura de mérito que avalia a correlação feita entre duas variáveis, pode ser avaliada pelo coeficiente de correlação linear (ICH, 2005). Na pesquisa, utilizou-se o *software* Excel, e calculou-se o coeficiente pela fórmula “=CORREL(ordenadas conhecidas; abcissas conhecidas)”. Esse coeficiente representa o nível de correlação entre as variáveis estudadas, sendo que 1 ou -1 representam valores de correlação perfeita, enquanto que o valor 0 indica nenhuma relação. Como o estudo busca relacionar o aumento de concentração com a área de um pico em um cromatograma, espera-se valores próximos a 1.

3.6.2 - Seletividade

A seletividade em um método cromatográfico pode ser simplificada como a garantia de que um pico seja representativo de um analito específico na amostra (ICH, 2005). No contexto desse trabalho, ela foi avaliada em três etapas complementares, a saber: comparação dos tempos de retenção entre cromatogramas obtidos de soluções-padrão e extratos; a fortificação (adição de uma quantidade conhecida de solução-padrão a um extrato); e a comparação do perfil de absorção na faixa UV-VIS do analito e da substância referente ao pico investigado. Além desse teste, também é necessário mostrar que não existem

outros analitos coeluinto com o analito estudado. Para garantir isso, é necessário realizar o teste de pureza de picos, que investiga se o perfil UV se mantém estatisticamente o mesmo por toda a extensão do pico investigado.

3.6.3 - Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) indicam as quantidades mínimas de um sinal analítico necessárias para, de forma estatisticamente significativa, detectar ou quantificar uma substância, respectivamente. Eles são calculados pelas fórmulas (1) e (2) (ICH, 2005) abaixo:

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{\alpha} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{\alpha} \quad (2)$$

Sendo σ o desvio padrão da curva de calibração e α o coeficiente de inclinação dela. O primeiro foi calculado utilizando o *software* Excel 2019 através da fórmula “=VAR.A(células com os valores das respostas da triplicata)^0,5”, enquanto o cálculo do segundo foi explicitado na *SEÇÃO 3.5*.

3.6.4 - Teste preliminar de recuperação do método cromatográfico

Um teste preliminar de recuperação foi conduzido de forma pouco convencional. Primeiro, curvas para cada isoflavona estudada contendo pontos correspondentes às concentrações da curva analítica na presença da matriz foram construídas, excetuando-se o ponto branco (*TABELA 3.9*). Os valores dos interceptos em módulo foram tomados como as concentrações dos analitos no extrato (*JULIANO, 2015*). A partir disso, nesse extrato adicionou-se solução de trabalho de GEN e DAI de concentração conhecida e efetuou-se a análise

cromatográfica (concentração final dos analitos no extrato igual a 26 mg mL⁻¹ para DAI e 25,3 mg mL⁻¹ para GEN). A recuperação foi dada pela *EQUAÇÃO 3* (PASCHOAL *et al.*, 2008).

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração média aferida pela curva}}{\text{Concentração real no extrato fortificado}} \quad (3)$$

3.7 - Tratamento de dados

Assim como nos tópicos anteriores, utilizou-se o *software* Microsoft Excel 2019 para efetuar cálculos estatísticos. Além disso, para a obtenção dos efeitos percentuais e absolutos e dos coeficientes da regressão matemática elaborada para os analitos, utilizou-se o *software* Octave (GUI) 4.2.1, com rotinas de programação desenvolvidas pelo professor Edenir Pereira-Filho explicitadas em PEREIRA e PEREIRA-FILHO (2018) e PEREIRA-FILHO (2016).

Para a triagem das variáveis, os efeitos principais (relacionados às variáveis individualmente) e secundários (resultante da interação entre variáveis) foram comparados quanto ao seu sinal, no caso dos efeitos absolutos, e ao seu valor, no caso dos efeitos percentuais. Nestes, também se adotou um valor mínimo de 10% para considerá-los importantes ao fenômeno e, conseqüentemente, selecioná-los para a otimização do experimento.

Para otimização dos experimentos, as regressões matemáticas foram utilizadas para avaliar qual valor as variáveis precisam assumir (dentro da amplitude analisada) para obter os maiores rendimentos de extração. A regressão elaborada consiste em um polinômio de segundo grau, exemplificado⁴ pela *EQUAÇÃO 4*:

$$R = a_0 + a_1V_1 + a_2V_2 + a_3V_1^2 + a_4V_2^2 + a_5V_1V_2 \quad (4)$$

⁴ A *EQUAÇÃO 4* apresenta um modelo de regressão para duas variáveis apenas. Para três variáveis, é necessário fazer combinações análogas que resultam em 10 coeficientes.

Onde $\alpha_0, \alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_4, \alpha_5$ são os coeficientes da regressão; V_1 e V_2 são os valores normalizados das variáveis (exemplo: $-1, 0, +1$); e R a resposta teórica ou modelada do fenômeno descrito pela regressão. A maximização dos polinômios obtidos foi efetuada pelo *plug-in solver*, uma ferramenta do Excel 2019.

3.8 - Cálculo de fatores sustentáveis

Para o cálculo dos fatores sustentáveis (FS), seguiu-se metodologia análoga ao exposto por FRANCISCHINI e colaboradores (2020), com modificação nas unidades de medida utilizadas. O resultado dos FS é dado pela EQUAÇÃO 5:

$$\text{Fator sustentável} = \frac{\text{quantidade de recurso utilizado na extração}}{\text{massa de analíto extraída}} \quad (5)$$

Sendo que a quantidade de recurso utilizado na extração é referente à energia (J), tempo (min), volume de solvente (L) e massa de amostra (g). Quanto menor o fator sustentável, mais eficiência de uso de recursos a técnica apresenta.

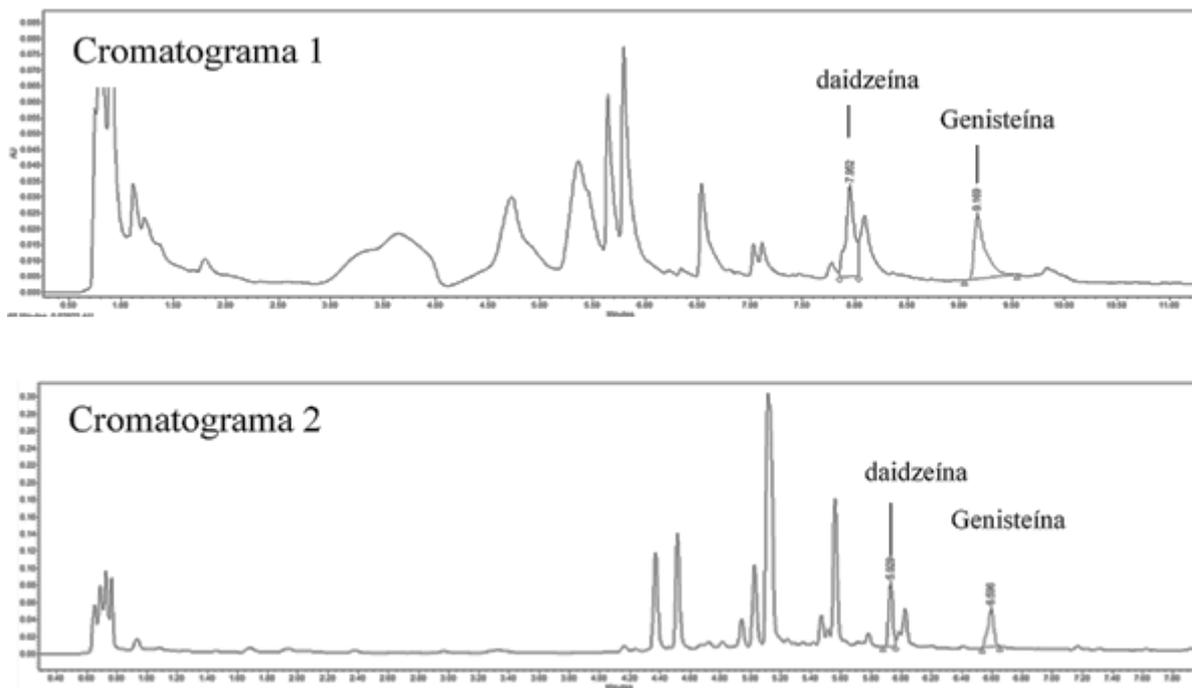
4 - Resultados e discussões

Nesta seção serão tratados os resultados do emprego dos procedimentos descritos na metodologia e, também, sua comparação com a literatura científica.

4.1 - Método cromatográfico

O resultado do teste de gradiente amplo em um extrato obtido pela homogeneização de alta velocidade nas duas colunas testadas pode ser observado na *FIGURA 4.1*. A descrição completa dos métodos cromatográficos utilizados nesse teste e nos subsequentes consta no *APÊNDICE A*. O formato dos picos (resolução) e o tempo de retenção mostram que a fase estacionária utilizada na análise que resultou no cromatograma 2 é mais apropriada para essa separação. Cabe ressaltar que a fase móvel da análise que resultou no cromatograma 1 era composta de água ultrapura, enquanto que para o cromatograma 2 esse solvente foi substituído por água ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico. De posse dessa informação, cabe destacar que não é possível identificar com clareza qual das duas fases estacionárias se apresenta como a mais adequada para resolução dos compostos investigados, visto que a presença de ácido altera os sítios ativos e, portanto, modifica a capacidade de separação. Com isso posto, foi decidido manter a fase estacionária BEH C18 por sua melhor resolução aparente.

FIGURA 4.1 - Cromatogramas referentes à separação realizada com gradiente amplo em duas fases estacionárias distintas: Cromatograma 1- Acquity HSS C18 e; Cromatograma 2 - Acquity BEH C8. Os picos investigados dos dois analitos estão indicados*.

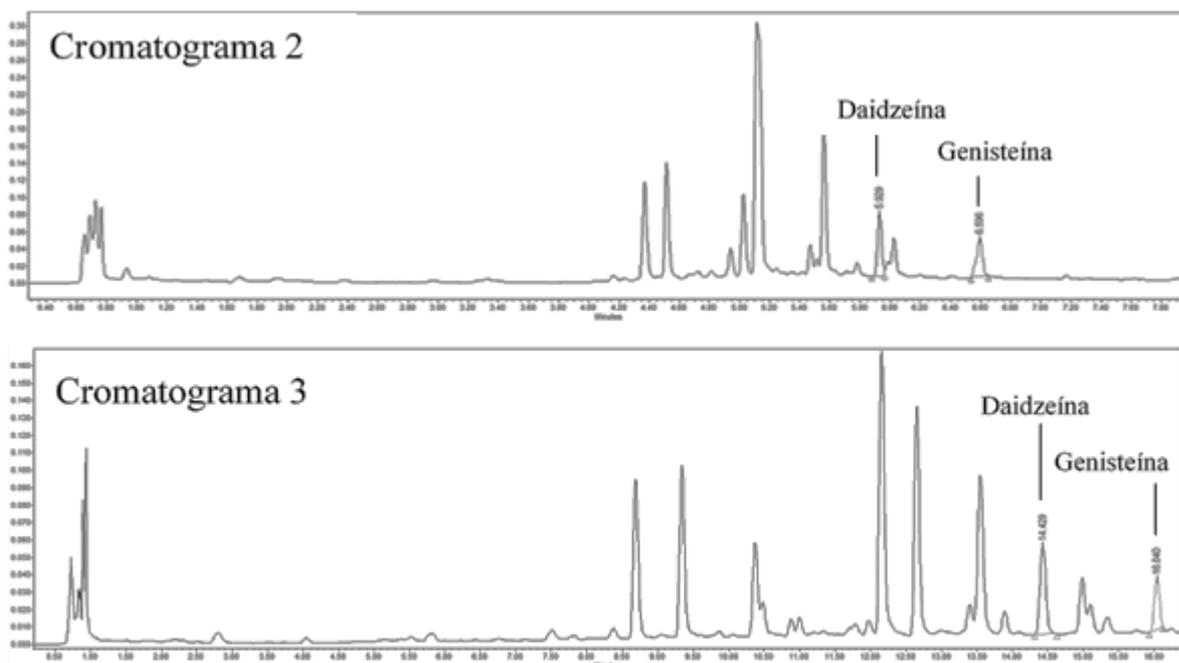


*O eixo das abscissas representa AU (Unidades de absorção) e varia de 0 a 0,085 para o cromatograma 1 e 0 a 0,3 para o cromatograma 2. O eixo das ordenadas informa o tempo de retenção em minutos e varia de 0 a $\approx 11,5$ para cromatograma 1 e de 0 a 7,5 min para o cromatograma 2.

Fonte: Elaboração própria.

Para tornar o método mais verde, testou-se a substituição de acetonitrila por metanol como solvente orgânico na eluição (melhor “pontuação” no guia GSK de escolhas de solvente (ALDER *et al.*, 2016)), o que mostrou ser proveitoso; o resultado dessa investigação pode ser observado na FIGURA 4.2. Ademais, a resolução dos picos se mostrou maior com a utilização de metanol. Esse melhoramento pode ser explicado pela alteração da fase estacionária frente ao solvente utilizado, modificando os sítios ativos e alterando assim a resolução da mistura complexa.

FIGURA 4.2 - Cromatogramas referentes à separação realizada com composição de fase móvel diferente em fase estacionária BEH C8: Cromatograma 2 - água ultrapura acidificada e acetonitrila; Cromatograma 3 - água ultrapura acidificada e metanol. Os picos investigados dos dois analitos estão indicados*.



*O eixo das abscissas representa AU (Unidades de absorção) e varia de 0 a 0,3 para o cromatograma 2 e de 0 a 0,16 para o cromatograma 3. O eixo das ordenadas informa o tempo de retenção em minutos e varia de 0 a $\approx 7,5$ para cromatograma 2 e de 0 a $\approx 16,5$ min para o cromatograma 3.

Fonte: Elaboração própria.

A partir disso, alguns ajustes no tempo do método e, conseqüentemente, no gradiente, foram feitos a fim de otimizar a etapa de análise como um todo, resultando no método descrito na *TABELA 4.1*.

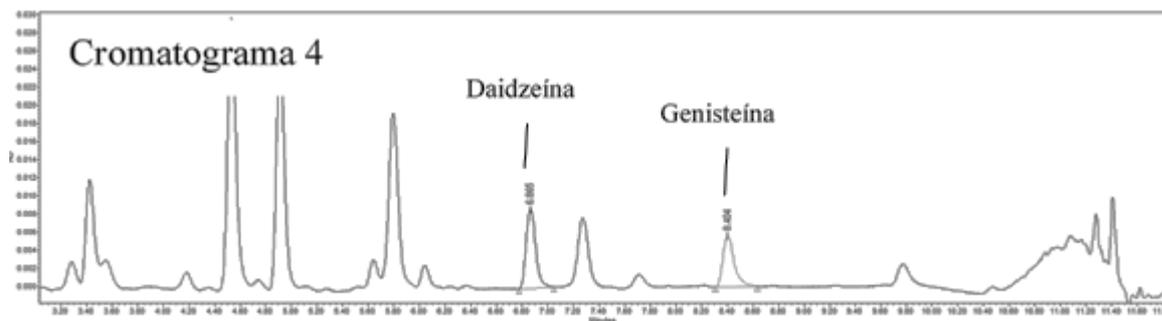
TABELA 4.1 - Composição da fase móvel durante o tempo e condições gerais do método.

Tempo (min)	% Água ultrapura acidificada (0,1% ácido fórmico)	% Metanol
0	75	25
9	50	50
10	0	100

Fonte: Elaboração própria.

O método final selecionado apresentou separações exemplificadas pelo cromatograma na *FIGURA 4.3*.

FIGURA 4.3 - Cromatograma referente à separação realizada na coluna BEH C8 com fase móvel de água ultrapura acidificada (0,1% ácido fórmico)*.



*O eixo das abscissas representa AU (Unidades de absorção) e varia de 0 a 0,03. O eixo das ordenadas informa o tempo de retenção em minutos e varia de 0 a ≈ 11 .

Fonte: Elaboração própria.

4.2 - Validação do método analítico

Os parâmetros obtidos para as duas curvas, na matriz e no solvente, podem ser observados na *TABELA 4.2*. Os dados mostram que ambas as curvas podem ser utilizadas no contexto deste trabalho, pois apresentam limites de quantificação e detecção suficientes para execução das análises. Os coeficientes de correlação são muito próximos de 1, evidenciando a linearidade da curva obtida. As informações necessárias para construção da curva analítica (área dos picos dos analitos e a concentração destes nos pontos preparados) encontram-se no *APÊNDICE B*. As tabelas de análise de variância (ANOVA) para as regressões elaboradas neste trabalho estão localizadas no *APÊNDICE C*, mostrando os parâmetros estatísticos que conferem confiabilidade às curvas de calibração.

TABELA 4.2 - Parâmetros de regressão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e coeficiente de correlação das curvas construídas.

Curva analítica preparada com metanol				
Analito	Equação	LD (mg g⁻¹)	LQ (mg g⁻¹)	Coefficiente de correlação (R)
Daidzeína	$y = 12.078x + 1.350$	1,516	5,054	0,99978
Genisteína	$y = 15.318x - 5.933$	0,492	1,639	0,99998

Curva analítica preparada na presença da matriz				
Analito	Equação	LD (mg g⁻¹)	LQ (mg g⁻¹)	Coefficiente de correlação (R)
Daidzeína	$y = 11.121x + 45.896$	0,485	1,617	0,99997
Genisteína	$y = 13.022x + 32.034$	0,537	1,792	0,99996

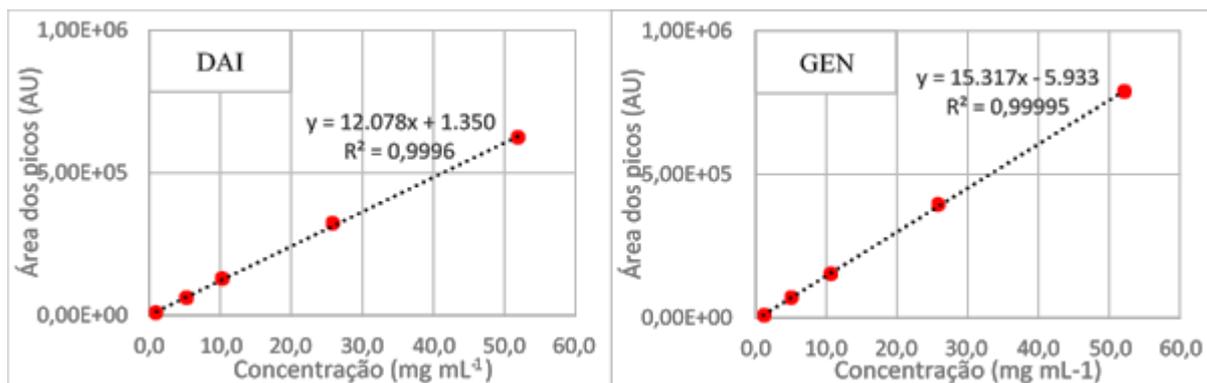
Fonte: Elaboração própria.

A fim de selecionar uma das duas curvas, aferiu-se o efeito de matriz. Esse efeito é a diferenciação da resposta instrumental causada pela presença de uma ou mais substâncias que compõe a matriz analisada. Quando o efeito de matriz é proeminente, pode gerar grandes variações em parâmetros estudados, como o de tempo de retenção. Como este é um dos fatores analisados no teste de seletividade, uma comparação entre os coeficientes de inclinação das curvas analíticas desenvolvidas deve ser realizada para estimar a intensidade do efeito de matriz (BRASIL, 2011). Para que seja possível afirmar que o efeito de matriz é pequeno, a razão entre os coeficientes citados deve ser mais próxima de 1, indicando igualdade entre as curvas.

A razão entre os coeficientes de inclinação das curvas para a DAI e GEN é de 0,92 e 0,85, respectivamente, mostrando que existe um efeito de matriz, mas que ele não é extremamente pronunciado, pois ele é próximo de 1,00. Isso mostra que é possível a utilização da curva analítica obtida apenas com solvente. Devido ao fato de a separação não ter sido prejudicada durante o andamento das análises, preferiu-se o emprego da curva de calibração preparada com metanol para quantificação dos resultados. A representação gráfica dela está apresentada

na FIGURA 4.4. O coeficiente de correlação (R^2), que foi de 0,9996 para DAI e 0,99995 para GEN, como evidenciado na figura, mostra que a regressão consegue explicar as variâncias dos resultados de forma eficaz, mais uma vez comprovando a linearidade da curva analítica.

FIGURA 4.4 - Representação gráfica das curvas de calibração da daidzeína (esquerda) e da genisteína (direita).



Fonte: Elaboração própria.

Quanto ao ensaio preliminar de recuperação feito com a curva analítica selecionada, valores de 95% para DAI e de 90% para GEN foram obtidos, estando dentro do intervalo de 70% a 120% expresso por RIBANI e colaboradores (2004) como aceitável.

Para determinar a seletividade, foi necessário primeiro mostrar que os picos investigados eram referentes aos analitos DAI e GEN. Para tanto, optou-se por comparar os tempos de retenção. O tempo de retenção (ou tempo necessário para que uma substância elua do sistema cromatográfico) é característico para cada composto em uma mistura em determinado método cromatográfico, portanto, ao utilizar o mesmo método cromatográfico para analisar uma mistura complexa e outra contendo apenas analitos, espera-se que os picos investigados apresentem tempos de retenção que sejam similares aos picos dos analitos, caso a mistura complexa apresente-os em sua composição (MERCOSUL, 2015). Para este trabalho, comparou-se as médias dos tempos de retenção das soluções

metanólicas de DAI e GEN com os tempos de retenção dos picos investigados nos extratos.

Os tempos de retenção médios dos picos investigados no cromatograma dos extratos produzidos por ambos os procedimentos de extração foram comparados com os tempos de retenção médios dos picos dos analitos nos cromatogramas das soluções de trabalho preparadas, mostrando que os tempos de retenção na solução de trabalho e no extrato são distintos, o que é um indicio da falta de seletividade do método. A *TABELA 4.3* sumariza esse dado. Dois fatores podem ter causado tal observação: o primeiro relacionado ao efeito de matriz, que causa deslocamentos no tempo de retenção em separações cromatográficas e que foi constatado pela comparação das curvas; e o segundo é operacional: o tempo de equilíbrio e limpeza entre injeções no cromatógrafo foi insuficiente, o que modifica os tempos de retenção devido às alterações dos sítios ativos da fase estacionária, causando modificações nos tempos de retenção. Esta segunda hipótese explica a variação nos tempos de retenção dos picos investigados nos inúmeros cromatogramas obtidos durante o trabalho.

TABELA 4.3 - Tempos de retenção médios (em min.) dos picos dos analitos (solução de trabalho) e dos picos investigados nos extratos.

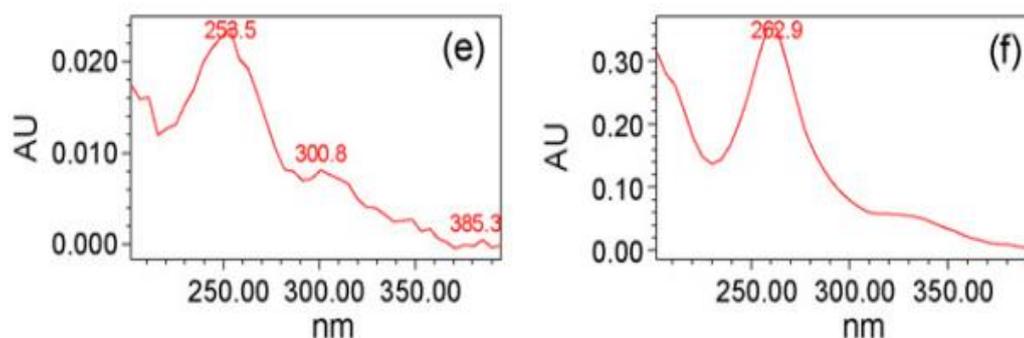
Análise	Analito	
	Daidzeína	Genisteína
Solução de trabalho	6,7	8,3
Extrato	7,3	8,8

Fonte: Elaboração própria.

Para a continuidade da análise, os perfis de absorção de luz na faixa ultravioleta-visível foram coletados e visualmente comparados. As isoflavonas da soja têm perfil de absorção UV-VIS bastante conhecido, apresentando mais alta absorção no comprimento de onda de 254 nm. Eles podem ser observados na *FIGURA 4.5*. Portanto, a comparação visual dos perfis de absorção pode ser

realizada de forma a certificar a presença dos analitos na amostra e verificar se os picos investigados correspondem a eles. Assim, foram obtidos e comparados os perfis UV-VIS dos picos referentes à GEN e DAI obtidos da análise da solução de trabalho e os picos investigados logrados da análise dos extratos.

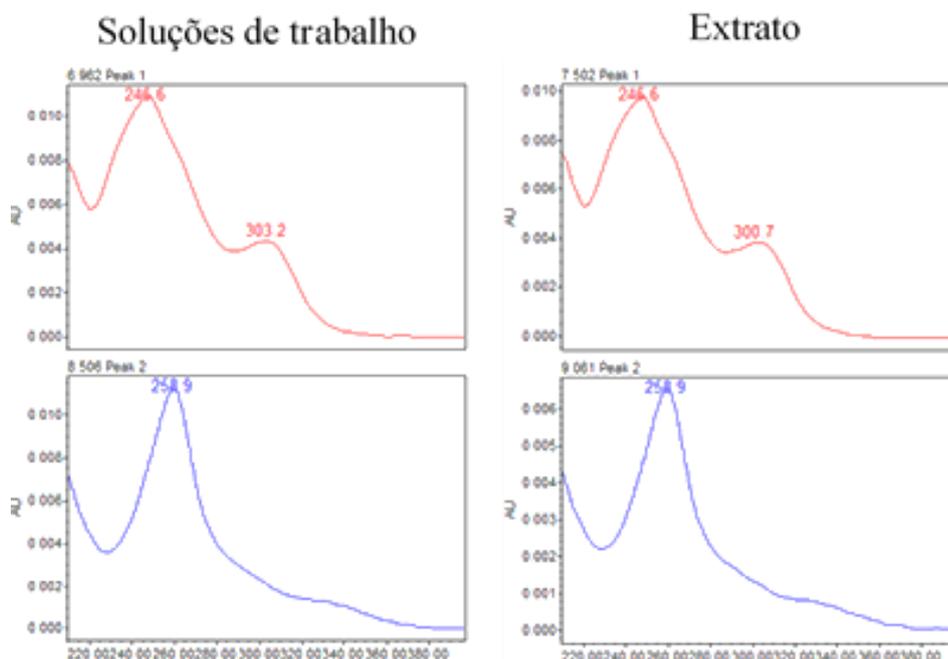
FIGURA 4.5 - Perfis de absorção UV-VIS das isoflavonas da soja. À esquerda, o perfil referente à daidzeína e, à direita, o perfil referente à genisteína.



Fonte: Adaptado de YANG *et al.* (2010).

A FIGURA 4.6 mostra essa comparação. É possível notar grande semelhança entre os perfis analisados. No entanto, como a soja possui isoflavonas que se diferenciam apenas pela conjugação com moléculas de açúcar e, como os açúcares no geral não apresentam absorção na faixa estudada, a seletividade ainda não podia ser comprovada, pois os picos investigados podem estar relacionados com as isoflavonas glicosiladas genistina e daidzina, por exemplo.

FIGURA 4.6 - Comparação dos perfis de absorção de luz na faixa UV-VIS dos picos dos analitos nas soluções de trabalho e nos extratos. DAI (região superior) e genisteína (região inferior).



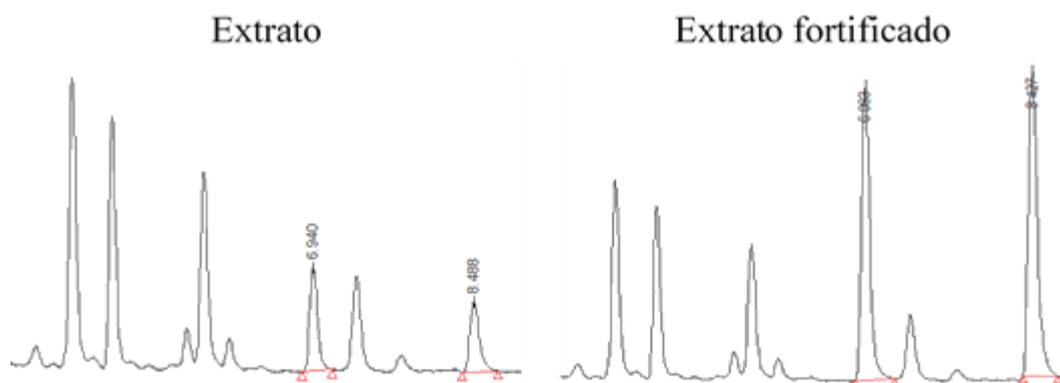
Fonte: Elaboração própria.

Em uma correlação linear positiva alta (ver *SEÇÃO 3.6.1*), observa-se que o aumento na quantidade de uma variável gera um acréscimo de igual intensidade em outra. No contexto do estudo, espera-se que a adição de determinada solução contendo GEN e DAI em um extrato cause como resultado o engrandecimento da área do pico investigado para os analitos (RIBANI *et al.*, 2004). Portanto, um extrato da amostra foi analisado e, subsequentemente, a ele foi adicionado um volume conhecido de solução de trabalho a fim de observar a diferenciação nas áreas dos picos nos respectivos cromatogramas.

Dando sequência ao teste de seletividade, observou-se o comportamento dos picos investigados em cromatogramas de extratos produzidos por homogeneização de alta velocidade ao se adicionar solução de trabalho em quantidades conhecidas (extrato fortificado). A *FIGURA 4.7* mostra o resultado obtido através dessa comparação. É possível notar que, nos fragmentos do cromatograma mostrados, apenas os picos investigados sofreram aumento

drástico com relação a outros picos presentes no cromatograma. Ainda, é possível notar que não houve distorção no perfil cromatográfico, o que indica que os picos investigados são correspondentes à GEN e DAI.

FIGURA 4.7 - Comparação dos picos investigados* sem (esquerda) e com adição (direita) de solução de trabalho dos analitos estudados.



*Os picos investigados possuem acima deles números referentes aos tempos de retenção (~6,9 min e ~8,4 min). Além disso, uma linha vermelha próxima à linha de base os evidência.

Fonte: Elaboração própria.

Todas essas análises servem como indício da seletividade do método quanto ao fato dos analitos investigados estarem presentes na amostra, bem como sua identificação. Entretanto, com os dados obtidos não é possível mostrar que os picos são referentes exclusivamente aos analitos e, portanto, a seletividade não pode ser totalmente comprovada (MS e ANVISA, 2017). Um teste simples e possível de ser realizado pelo *software* EMPOWER é a comparação do perfil UV no tempo de retenção analisado tanto dos picos investigados como dos picos correspondentes aos analitos padrão. Esse teste, chamado de “Pureza de picos”, busca mostrar estatisticamente que os picos são referentes apenas ao composto investigado. Entretanto, por conta da pandemia de COVID-19, não foi possível dar sequência a esse teste até o fim do período deste trabalho.

4.3 - Resultados das extrações

Nesta seção serão tratados os rendimentos de extração obtidos pelas diversas técnicas e planejamentos aplicados, bem como os resultados dos efeitos das variáveis e as regressões elaboradas.

4.3.1 - Resultados da extração por homogeneizador de alta velocidade

Esta seção trará os resultados obtidos para a EAH tanto do PFF quanto do PCC.

4.3.1.1 - Resultados do planejamento fatorial fracionário para a extração assistida por homogeneizador de alta velocidade

O PFF foi aplicado para EAH, e as análises dos extratos resultantes mostraram, para cada experimento, os valores para concentração dos analitos exibidos na *TABELA 4.4*. As variáveis estudadas foram: composição do solvente extrator (V_1); tempo (V_2); razão amostra-solvente (V_3); e velocidade de rotação (V_4). As áreas dos picos referentes aos analitos nos extratos produzidos por cada experimento deste PFF podem ser observadas no *APÊNDICE D*.

TABELA 4.4 - Resultados do planejamento fatorial fracionário das extrações assistidas por homogeneizador de alta velocidade para daidzeína e genisteína.

Experimento	Variável normalizada				Rendimento	
					DAI (mg g ⁻¹)*	GEN (mg g ⁻¹)*
	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄		
1	1	1	-1	-1	0,108	0,064
2	1	1	1	1	0,114	0,071
3	1	-1	-1	1	0,105	0,064
4	1	-1	1	-1	0,101	0,064
5	-1	1	-1	1	0,053	0,019
6	-1	1	1	-1	0,081	0,032
7	-1	-1	-1	-1	0,068	0,026
8	-1	-1	1	1	0,109	0,050

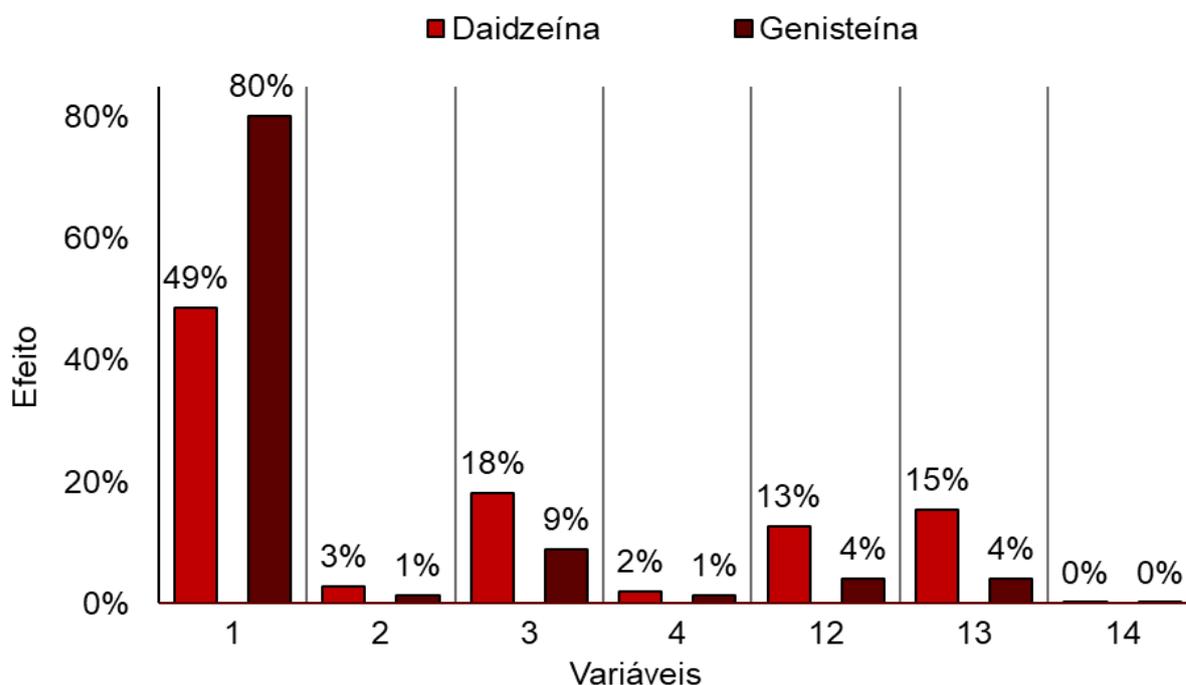
*Massa de analito por massa de amostra utilizada na extração.

Fonte: Elaboração própria.

Os experimentos com melhores rendimentos foram: 1, 2, 3 e 8 para DAI e 1, 2, 3 e 4 para GEN. É possível notar que a composição do solvente extrator foi empregada no nível alto para a maior parte destes.

Os efeitos percentuais das variáveis primárias (efeitos principais) e secundárias (efeito de interação entre variáveis ou efeitos secundários) estão evidenciados na *FIGURA 4.8*. Os efeitos principais 1 e 3 se apresentaram significativos para ambos analitos, e os efeitos secundários 12 e 13 são significativos para o rendimento de extração da DAI.

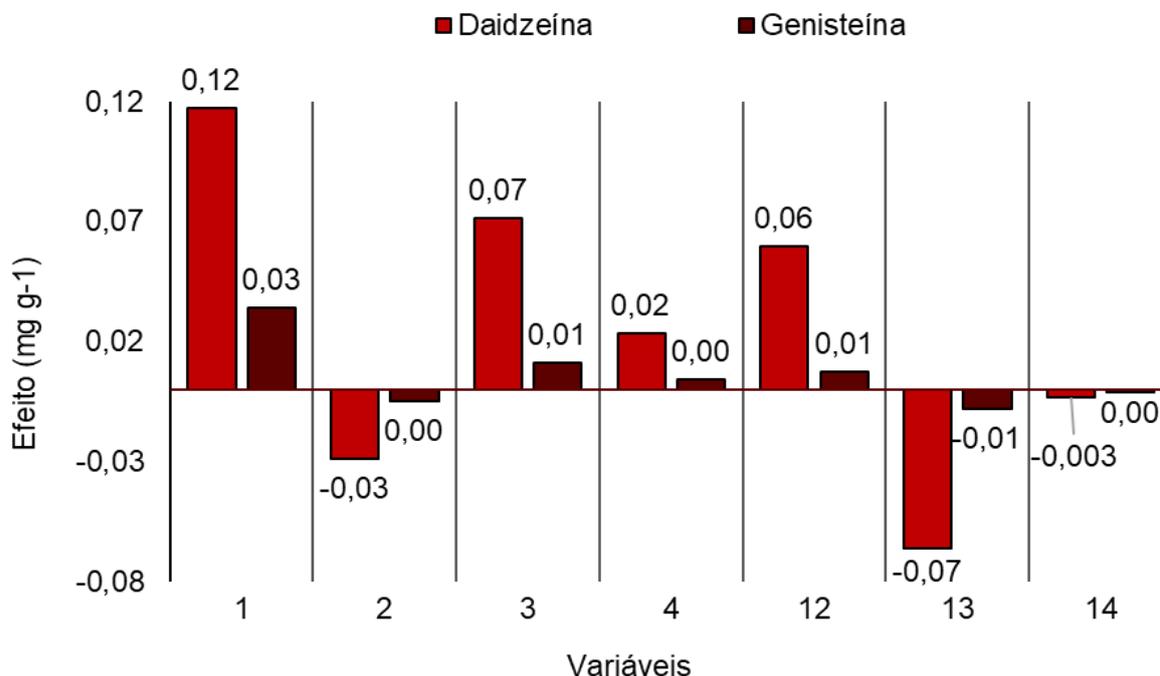
FIGURA 4.8 - Efeitos percentuais das variáveis para o planejamento fatorial fracionário aplicado para extração assistida por homogeneizador de alta velocidade.



Fonte: Elaboração própria.

Os efeitos absolutos primários e secundários estão expostos na FIGURA 4.9. Os efeitos 1, 3 e 12 selecionados anteriormente possuem valor positivos para DAI, enquanto o efeito 13 apresenta valor negativo. Para GEN, esses efeitos (1 e 3) são maiores que zero. A variável “tempo” e a variável “velocidade de rotação” não exibiram efeitos significativos (>10%). O autor conjectura que, para o tempo de extração, a diferença entre os níveis máximo e mínimo (5 e 2 min, respectivamente) foi pequena para avaliar qualquer efeito significativo na extração. Entretanto, acredita-se que a técnica não necessite de tempos maiores, já que o nível mais baixo empregado para variável “velocidade de rotação” (10.900 rpm) apresenta rotações por minuto maiores que o valor crítico (8.900 rpm) necessário para o cisalhamento e o consequente rompimento das células (GÜNERKEN *et al.*, 2015). Ainda por esse motivo, a variável “velocidade de rotação” foi apontada como tendo efeito negligenciável no planejamento.

FIGURA 4.9 - Efeito absoluto das variáveis para o planejamento fatorial fracionário aplicado para extração assistida por homogeneizador de alta velocidade.



Fonte: Elaboração própria.

Dados estes resultados, é possível afirmar que, nas condições estudadas, a maximização do rendimento de extração tanto de DAI quanto de GEN é alcançada quando as variáveis “composição do solvente extrator” e “razão amostra-solvente” se apresentam em nível máximo (+1). Como a variável 2 apresenta-se com efeito secundário importante para o fenômeno, opta-se por mantê-la em nível alto também.

Os analitos estudados não apresentam polaridade acentuada. Uma evidência para essa afirmação é que experimentos que empregaram solução extratora de concentrações de etanol 20% (volume/volume) (5, 6 e 7) não apresentaram alto valor de rendimento. Um estudo por YOSHIARA e colaboradores (2012) analisou quais as melhores misturas de solventes com relação ao rendimento de extração de isoflavonas agliconas de grãos de soja. Dentre os líquidos analisados figuravam água, acetona, acetonitrila e etanol, e o resultado foi que a mistura mais promissora para extração dessas substâncias é a

composta de água e acetona 1:1 (v/v), justificando mais uma vez a baixa polaridade da GEN e DAI. TRAN *et al.* (2019) realizaram uma pesquisa de otimização da extração de isoflavonas de farinha de soja que avaliou a melhor condição da variável “composição do solvente extrator” utilizando soluções de etanol em água de 60% a 100% de concentração. Esse estudo concluiu que a solução 80% EtOH/H₂O é a melhor para o rendimento da extração, concordando com os resultados discutidos nesta seção.

Com relação à variável “razão amostra-solvente”, o estudo citado anteriormente (TRAN *et al.*, 2019) conclui que uma menor⁵ razão sólido-líquido é a melhor condição de extração (ao encontro dos resultados mostrados nesta seção), utilizando-se dessa variável com valor de 0,037 g L⁻¹ no experimento mais bem sucedido com relação ao rendimento. Essa tendência pode ser explicada pois o mecanismo de difusão depende do gradiente das concentrações dos analitos na solução. A presença de maior quantidade de solvente eleva a diferença das concentrações ao longo da solução, mantendo o processo de difusão por mais tempo, assim aumentando a quantidade de analitos em solução até o momento em que o equilíbrio é atingido (LE *et al.*, 2019).

O experimento que satisfaz as condições ótimas acima depreendidas é o de número 2, que apresenta o maior rendimento de extração. As condições reais nele aplicadas foram: solução 80% EtOH/H₂O como solvente extrator, tempo de 5 min, razão amostra-solvente 0,1 g mL⁻¹ e velocidade de rotação 21.100 rpm.

⁵ É necessário atentar ao fato de que o nível máximo para esta variável apresentou a razão de 0,1, enquanto o nível mínimo apresentou a razão igual a 0,2. Apesar de contraintuitivo, essa escolha não afeta as conclusões depreendidas do planejamento.

4.3.1.2 - Resultados do planejamento composto central para extração assistida por homogeneizador de alta velocidade

Acordando com as considerações feitas na seção anterior, selecionou-se as variáveis “razão amostra-solvente”, como V_1 , e “composição do solvente extrator”, como V_2 , para a otimização do experimento. O tempo de extração foi fixado em 3 min e a velocidade de rotação promovida pelo homogeneizador foi mantida em 14.500 rpm. Os rendimentos de extrações dos experimentos do PCC são exibidos pela *TABELA 4.5*, bem como os resultados das triplicatas no ponto central (variáveis no nível 0). Como possível comparar com a *TABELA 4.4*, os valores dos rendimentos foram menores para os experimentos do PCC, o que não era esperado. Esse fato pode ter ocorrido devido a uma mudança no procedimento de extração, que consistiu em fixar o volume de solvente extrator utilizado em 2,5 mL, na tentativa de reduzir o emprego de reagentes. O resultado mostrou que existe um volume mínimo de solvente que a técnica, como foi empregada, necessita para a extração ser eficaz. As médias das áreas dos picos referentes aos analitos nos extratos produzidos por cada experimento deste PCC podem ser observadas no *APÊNDICE D*.

TABELA 4.5 - Resultados do planejamento composto central das extrações assistidas por homogeneizador de alta velocidade para daidzeína e genisteína.

Experimento	Variável normalizada		Rendimento	
			DAI (mg g ⁻¹)	GEN (mg g ⁻¹)
	V ₁	V ₂		
1	$-\sqrt{2}$	0	0,082*	0,055
2	$\sqrt{2}$	0	0,072	0,045
3	0	$-\sqrt{2}$	0,083	0,050
4	0	$\sqrt{2}$	0,090	0,056
5	1	-1	0,077	0,045
6	1	1	0,087	0,053
7	-1	1	0,079	0,054
8	-1	-1	0,086	0,053
9	0	0	0,083	0,052
10	0	0	0,074	0,047
11	0	0	0,088	0,058

*Valor correspondente abaixo do LQ.

Fonte: Elaboração própria.

Ao efetuar os cálculos de desvio padrão, os valores de $\pm 0,007$ mg g⁻¹ e $\pm 0,006$ mg g⁻¹ foram obtidos para DAI e GEN, respectivamente. Comparando com os resultados dos experimentos, os desvios padrão evidenciam que não há diferença estatística nos dados, o que compromete a realização da regressão matemática.

Para fins de treinamento da habilidade de elaborar regressões e otimizá-las, optou-se por dar continuidade ao trabalho, apesar desse obstáculo. Os coeficientes calculados através dos resultados deste planejamento são representados pela *EQUAÇÃO 6* para DAI e *EQUAÇÃO 7* para GEN:

$$C_d = 0,0819 - 0,0020V_1 + 0,0016V_2 - 0,0023V_1^2 + 0,0029V_2^2 + 0,0043V_1V_2 \quad (6)$$

$$C_g = 0,0522 - 0,0028V_1 + 0,0021V_2 - 0,0014V_1^2 + 0,0034V_2^2 + 0,0018V_1V_2 \quad (7)$$

Os valores C_d e C_g correspondem à concentração teórica de DAI e GEN, de acordo com o modelo matemático obtido, nesta ordem; V_1 à razão amostra-solvente normalizada e V_2 à composição do solvente extrator normalizada. Para otimizar a *EQUAÇÃO 6*, o valor assumido por V_1 deve ser 0 e, por V_2 , deve ser $+\sqrt{2}$. No caso da *EQUAÇÃO 7*, o valor deve ser de $-0,1$ para V_1 e $+\sqrt{2}$ para V_2 . Um dos reflexos da não diferenciação estatística dos resultados é que o coeficiente independente das variáveis 1 e 2 é muito maior que os outros, fazendo com que as variações de V_1 e V_2 não afetem de forma significativa as respostas, de acordo com o modelo calculado.

O experimento que apresenta condições próximas às referidas é o de número 4, que apresenta os seguintes valores reais para as variáveis: razão amostra-solvente: $0,1 \text{ g mL}^{-1}$; e solução extratora 90% EtOH/H₂O. Um estudo que apresenta um procedimento de extração de isoflavonas de *okara*⁶ apresentou procedimento de extração muito parecido ao da EAH ao empregar um processador de alimentos. A condição ótima de extração por ele descrita foi bastante similar à detalhada nessa seção, sendo a razão amostra-solvente tomada em $0,1 \text{ g mL}^{-1}$ e a solução extratora composta de 80% EtOH/H₂O (NILE *et al.*, 2020).

4.3.2 - Resultados da extração assistida por ultrassom

Esta seção trará os resultados obtidos para a EAU tanto do PFC quanto do PCC.

⁶ Resíduo da produção de leite de soja.

4.3.2.1 - Resultados do planejamento fatorial completo para a extração assistida por ultrassom

O PFC foi aplicado para EAU, e os rendimentos obtidos podem ser averiguados na *TABELA 4.6*, junto das quantidades normalizadas das três variáveis estudadas, a saber: frequência (V_1), tempo (V_2) e composição do solvente extrator (V_3). As áreas dos picos referentes aos analitos nos extratos produzidos por cada experimento deste PCC podem ser observadas no *APÊNDICE D*.

TABELA 4.6 - Resultados do planejamento fatorial completo das extrações assistidas por ultrassom para daidzeína e genisteína.

Experimento	Variável			Rendimento	
	V_1	V_2	V_3	DAI	GEN
				(mg g^{-1})	(mg g^{-1})
1	1	1	1	0,059	0,039
2	1	1	-1	0,058	0,033
3	1	-1	1	0,064	0,043
4	1	-1	-1	0,070	0,042
5	-1	1	1	0,065	0,042
6	-1	1	-1	0,052	0,032
7	-1	-1	1	0,084	0,054
8	-1	-1	-1	0,054	0,032

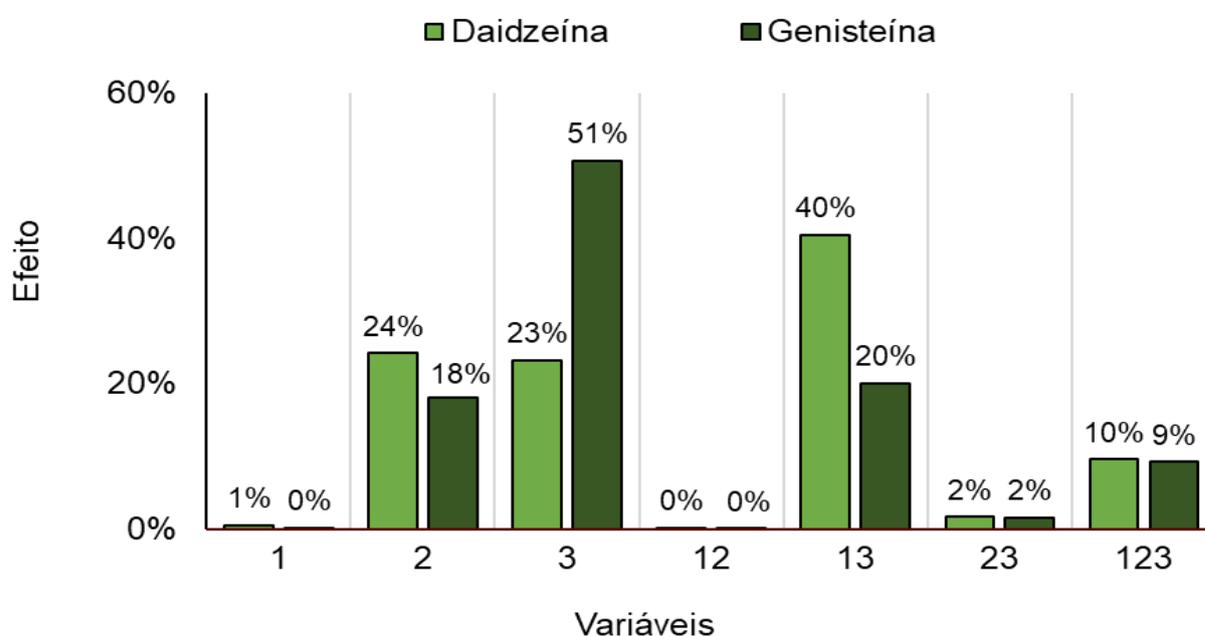
Fonte: Elaboração própria.

Os experimentos 3, 4, 5 e 7 foram os que tiveram maior rendimento de extração para ambos os analitos, sendo que a maioria destes apresenta variável tempo em nível baixo.

Os efeitos percentuais estão representados graficamente na *FIGURA 4.10*. Os efeitos 2, 3 e 13 são os mais relevantes para os dois analitos estudados, pois apresentam efeitos percentuais maiores. O autor pressupõe que o efeito principal da variável “frequência” não tenha sido significativo pois as condições máximas e mínimas empregadas não foram suficientemente distintas. Entretanto,

as frequências sonoras maiores que 100 kHz, consideradas de menor intensidade (SORIA e VILLAMIEL, 2010), não são capazes de produzir bolhas de cavitação tão grandes quanto as obtidas por frequências sonoras menores (FAHMI *et al.*, 2014), como as empregadas no estudo. Quanto menor a bolha de cavitação, menor o impacto de sua ruptura e, por consequência, menor o efeito na extração (FAHMI *et al.*, 2014). Portanto, apesar de não significativa ao considerar o efeito principal, a variável “frequência” foi tida como estando próxima ao nível ótimo.

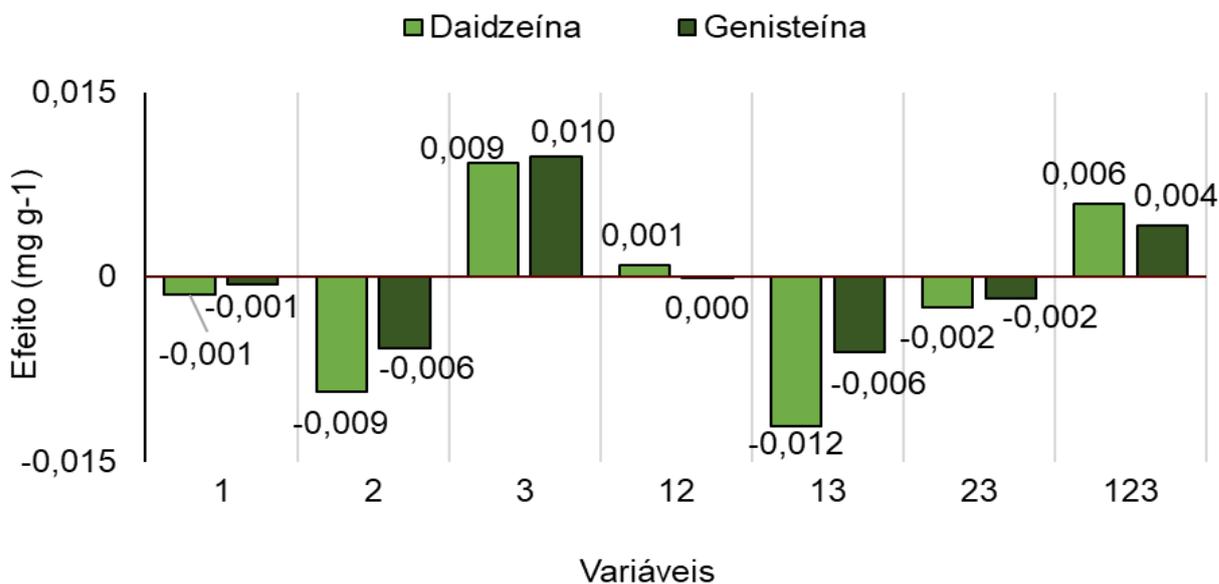
FIGURA 4.10 - Efeitos percentuais das variáveis para o planejamento fatorial completo aplicado para extração assistida por ultrassom.



Fonte: Elaboração própria.

A FIGURA 4.11, por sua vez, apresenta os efeitos absolutos primários e secundários. Para as duas substâncias, os efeitos significativos apresentam-se da seguinte maneira: o efeito absoluto da variável 3 é positivo, enquanto que os efeitos absolutos 2 e 13 são menores que zero.

FIGURA 4.11 - Efeitos absolutos das variáveis para o planejamento fatorial completo aplicado para extração assistida por ultrassom.



Fonte: Elaboração própria.

De posse destes resultados, pode ser destacado que, nas condições em estudo, a maximização do rendimento de extração de ambos os compostos analisados ocorre quando as variáveis “tempo” e “frequência” são mantidas em nível mínimo e a variável “composição do solvente extrator” é fixada no nível máximo.

De maneira análoga ao que foi expresso na *SEÇÃO 4.2.1*, a tendência observada da composição do solvente extrator ocorre por razão da polaridade intermediária dos compostos. Um adendo específico para a técnica em questão é que uma maior quantidade de água na composição do solvente pode causar a degradação das isoflavonas, pois nestas condições ocorre o aumento da formação de radicais derivados da água pelas ondas ultrassônicas (ROSTAGNO *et al.*, 2003).

A extração dos analitos teve seu rendimento melhorado com a diminuição do tempo de procedimento. FAHMI *et al.* (2014) observaram a relação inversa para extração de isoflavonas de leite de soja, sendo que a condição ótima para a variável, que foi estudada entre 20 e 60 min, foi a com seu valor máximo.

ROSTAGNO e colaboradores (2003), utilizando a semente de soja como amostra, também apontam que o tempo é proporcional ao rendimento de extração para a técnica que utiliza o ultrassom. Essa controvérsia entre as tendências observadas neste trabalho e nos supracitados talvez possa ser explicada pela distinção dentre as três amostras com relação ao estado físico, à quantidade de isoflavonas presente e à cinética de extração. Outra hipótese, menos creditada pelo autor desta dissertação, é que a aplicação de tempos de extração ainda maiores (>40 min) causaria a tendência observada por esses estudos.

O experimento que apresenta as condições ótimas é o de número 7, e as quantidades reais das variáveis foram: 25 kHz de frequência, tempo de extração de 5 min e solução de 80% EtOH/H₂O como solvente extrator.

4.3.2.2 - Resultados do planejamento composto central para a extração assistida por ultrassom

A variável “razão amostra-solvente” (V_1), que se mostrou significativa para extração efetuada com homogeneizador de alta velocidade, também foi incluída nesse planejamento. Ainda, pelas considerações realizadas no tópico anterior, as variáveis “tempo” (V_2) e “composição do solvente extrator” (V_3) foram selecionadas para o estudo de otimização. A variável “frequência ultrassônica” foi fixada em 25 kHz. Os resultados das extrações do PCC estão evidenciados na *TABELA 4.7*, assim como os resultados das triplicatas no ponto central. Os experimentos com maiores rendimentos foram o 4 e o 15. As áreas dos picos referentes aos analitos nos extratos produzidos por cada experimento deste PCC podem ser observadas no *APÊNDICE D*.

TABELA 4.7 - Resultados do planejamento composto central das extrações assistidas por ultrassom para daidzeína e genisteína.

Experimento	Variável			Rendimento	
	V ₁	V ₂	V ₃	DAI	GEN
				(mg g ⁻¹)	(mg g ⁻¹)
1	-1	-0,68 *	-1	0,088	0,062
2	1	-0,68	-1	0,098	0,063
3	-1	1	-1	0,134	0,083
4	1	1	-1	0,141	0,081
5	-1	-0,68	1	0,075	0,055
6	1	-0,68	1	0,053	0,037
7	-1	1	1	0,112	0,071
8	1	1	1	0,075	0,050
9	-1,68	0	0	0,054**	0,041
10	1,68	0	0	0,135	0,083
11	0	-1,68	0	0,098	0,065
12	0	1,68	0	0,091	0,059
13	0	0	-1,68	0,127	0,074
14	0	0	1,68	0,102	0,066
15	0	0	0	0,140	0,079
16	0	0	0	0,128	0,077
17	0	0	0	0,129	0,079

*Por um erro, os experimentos com variável 2 em nível -1 foram efetuados em nível -0,68.

**Valor correspondente abaixo do LQ.

Fonte: Elaboração própria.

Para esse conjunto de experimentos, o desvio padrão calculado foi de $\pm 0,007 \text{ mg g}^{-1}$ para DAI e de $\pm 0,001 \text{ mg g}^{-1}$ para GEN. Novamente, os resultados estatisticamente são semelhantes ou muito próximos, o que prejudica o modelo de regressão elaborado. Apesar disso, o autor optou por também calcular a regressão matemática para otimização, assim como para o procedimento com homogeneizador de alta velocidade. Essa decisão se pautou no fato de que esse seria o próximo passo importante que figura nos trabalhos científicos nesta área, além de dar sequência direta às conclusões obtidas nas *SEÇÕES 4.3.1 e 4.4.1*.

Os coeficientes para regressão calculados através dos resultados deste planejamento são exibidos na *EQUAÇÃO 8* para DAI e *EQUAÇÃO 9* para GEN:

$$C_d = 0,129 - 0,008V_1 + 0,011V_2 - 0,013V_3 - 0,14V_1^2 - 0,012V_2^2 - 0,007V_3^2 - 0,005V_1V_2 - 0,009V_1V_3 - 0,005V_2V_3 \quad (8)$$

$$C_g = 0,077 + 0,002V_1 + 0,005V_2 - 0,006V_3 - 0,006V_1^2 - 0,005V_2^2 - 0,003V_3^2 - 0,002V_1V_2 - 0,005V_1V_3 - 0,002V_2V_3 \quad (9)$$

Os valores C_d e C_g correspondem à concentração teórica, de acordo com o modelo matemático obtido, de DAI e GEN, nessa ordem; V_1 à razão amostra-solvente normalizada, V_2 ao tempo e V_3 à composição do solvente extrator normalizada. Com objetivo de maximizar o resultado da *EQUAÇÃO 8*, para a DAI, o valor assumido por V_1 deve ser +0,7, por V_2 também +0,7 e V_3 deve ser -1,64. No caso da *EQUAÇÃO 9*, para a otimização da extração de GEN, o valor deve ser de +0,7 para V_1 , +0,7 para V_2 e -1,68 para V_3 . Essas condições são próximas entre si; portanto, as duas substâncias podem ter seu rendimento de extração otimizado aplicando condições similares.

Assim como na *SEÇÃO 4.3.1.2*, a otimização dos experimentos não remete a valores mínimos para a variável “razão amostra-solvente”, o que contradiz diretamente os achados da *SEÇÃO 4.3.2.1*. Uma hipótese levantada pelo autor é que a extração dos compostos ocorre rapidamente por conta da alta disponibilidade de solvente em relação ao sólido, como discutido anteriormente. Entretanto, as condições de pressão e temperatura para a ruptura das células oferecidas pelos mecanismos de funcionamento de ambos equipamentos acabam por resultar na degradação de parte das isoflavonas extraídas e, por consequência, diminuem o rendimento final dos experimentos que contam com menores razões amostra-solvente (1, 5 e 9, especialmente).

O experimento que apresenta condições próximas às referidas é o de número 4, que apresenta os seguintes valores reais para as variáveis: razão amostra-solvente de $0,13 \text{ g mL}^{-1}$; tempo de extração de 8,4 min; e composição do solvente extrator de 66% EtOH/H₂O. A pesquisa realizada por JIANMING e colaboradores (2013) com intuito de otimizar a extração de GEN de queijo de soja chinês assistida por ultrassom apresenta condições próximas, contando com solvente extrator 65% EtOH/H₂O, $0,15 \text{ g mL}^{-1}$ de razão amostra-solvente, mas com um tempo de extração bastante distinto, 2 h 30 min. Entretanto, o trabalho não menciona frequência ultrassônica aplicada, o que pode ser a causa da diferença observada com relação à variável tempo.

4.4 - Comparação com outros estudos

Neste tópico serão tratados os resultados obtidos comparativamente com estudos científicos quanto à concentração dos analitos e ao rendimento de extração.

4.4.1 - Comparação das concentrações observadas entre analitos

Os resultados dos experimentos mostram que a concentração de DAI na amostra é 60% superior à de GEN, aproximadamente. Importante ressaltar que a razão entre a massa molecular de DAI e GEN é igual a 0,94. HOECK e colaboradores (2000) mostram evidências de que extratos de sementes de soja de diferentes cultivares apresentam concentrações maiores de DAI que das outras isoflavonas em suas formas livres. Ainda, SEO *et al.* (2017) demonstram que essa relação é válida para os extratos de diversas estruturas da planta e, também, em sementes em distintos estágios de maturação. Como o conteúdo de isoflavonas varia nas diversas partes estruturais da planta (ARAÚJO *et al.*, 2013), espera-se que exista uma variação entre os resultados deste estudo com os de pesquisas

futuras com amostras similares de outras empresas, pois a composição do resíduo agroindustrial, com relação às estruturas da planta, depende das particularidades de cada mecanismo de processamento que o gera.

4.4.2 - Comparação quanto ao rendimento de extração

Durante o desenvolvimento desta pesquisa, o autor não encontrou nenhum estudo que pudesse ter seus resultados comparados com os obtidos devido à natureza altamente particular da amostra, que consiste em uma mistura não proporcional de vagens, grãos quebrados e cascas. Além disso, a técnica de EAH parece ser pouco empregada ou então caracterizada na redação dos trabalhos científicos de outra forma (por exemplo, tratada como uma adaptação de uma extração dita convencional). Portanto, o intuito desta seção será observar os resultados de estudos similares. Destarte, os melhores rendimentos de extração obtidos nessa pesquisa foram $0,114 \text{ mg g}^{-1}$ para DAI e $0,071 \text{ mg g}^{-1}$ para GEN empregando homogeneizador (experimento 2, PFF) e $0,140 \text{ mg g}^{-1}$ para DAI e $0,079 \text{ mg g}^{-1}$ para GEN utilizando o banho ultrassônico (experimento 15, PCC).

Em um estudo de GASPARETTO *et al.* (2012), os autores utilizaram a EAU para quantificar diversas isoflavonas em diferentes amostras de produtos e coprodutos do processamento da soja, como o farelo de soja, a semente sem casca, e as cascas. No estudo, as concentrações de DAI e GEN encontradas nas cascas foram $0,01 \text{ mg g}^{-1}$ e $0,03 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente. Comparando com os resultados obtidos nesta pesquisa, têm-se uma evidência de que as cascas presentes no resíduo agroindustrial estudado não são responsáveis pelo conteúdo de isoflavonas agliconas extraído.

Em outro estudo, BARFI *et al.* (2009) empregaram a técnica de dispersão de matriz em fase sólida para extrair isoflavonas de grãos de soja e de seus resíduos (processamento não especificado), e obtiveram rendimento de $0,022 \text{ mg g}^{-1}$ de DAI e $0,020 \text{ mg g}^{-1}$ de GEN na extração empregando os

resíduos. Outro estudo feito por XU *et al.* (2004), que utiliza membranas para filtragem e extração de isoflavonas agliconas totais dos resíduos de processamento de leite de soja, obteve $0,391 \text{ mg g}^{-1}$ de rendimento, mostrando evidências de que o tipo de processamento que gera o resíduo pode afetar intensamente a quantidade obtida de isoflavonas.

A maceração de farelo de soja com intuito de otimizar a extração de isoflavonas conduzida por TRAN e colaboradores (2019) obteve rendimentos similares ao deste estudo para DAI ($0,130 \text{ mg g}^{-1}$), porém um rendimento maior para GEN ($0,130 \text{ mg g}^{-1}$). Uma grande diferença é que os autores também incluem como variável o pH e a temperatura. Eles argumentam que esta última pode afetar proporcionalmente a extração devido ao aumento da capacidade de difusão do solvente e a solubilidade dos analitos. Importante notar que o tempo utilizado (67 min) é muito superior ao empregado na pesquisa descrita nesta dissertação, o que é uma desvantagem em relação à sustentabilidade do processo.

Ainda, ŠIBUL e colaboradores (2016) avaliaram a presença de isoflavonas, dentre elas GEN e DAI, em quatro diferentes cultivares de soja nas ervas secas e nas raízes. O estudo encontrou quantidades entre $0,041$ e $0,112 \text{ mg g}^{-1}$ de DAI e $0,015$ e $0,039 \text{ mg g}^{-1}$ de GEN nas ervas secas e entre $0,856$ e $1,712 \text{ mg g}^{-1}$ de DAI e $0,159$ e $0,270 \text{ mg g}^{-1}$ de GEN nas raízes. A distribuição das isoflavonas nas partes da planta é bastante distinta, sendo que esses compostos se concentram mais nas raízes e nas sementes (KLEJDUS *et al.*, 2005). Logo, dada a variância encontrada nas raízes por ŠIBUL e colegas (2016), é esperado que diferentes cultivares tenham quantidades distintas dos analitos estudados.

Por último, um estudo de extração realizado com resíduo agrícola (biomassa deixada pelas colheitadeiras no ato da colheita) analisou o conteúdo de isoflavonas de vagens, grãos, galhos e folhas depositados no solo após a colheita (CARNEIRO *et al.*, 2020). Os rendimentos de extração foram sistematizados e podem ser vistos na TABELA 4.8. Esses resultados promissores evidenciam a necessidade de empregar o conceito de biorrefinaria em mais etapas de

processamento de soja. Tanto o resíduo agrícola como o resíduo de pré-limpeza apresentam quantidade significativas de isoflavonas e, na lógica de processamento atual, são inevitáveis.

TABELA 4.8 - Rendimentos de extração de daidzeína e genisteína obtidos por CARNEIRO *et al.* (2020) de diferentes partes da planta deixadas pela colheitadeira (resíduo agrícola).

Amostra	Isoflavona	
	DAI (mg g ⁻¹)	GEN (mg g ⁻¹)
Galhos	0,297	0,018
Grãos	0,097	0,041
Folhas	0,231	0,030
Vagens	0,076	0,004

Fonte: Dados extraídos de CARNEIRO (2020).

Por fim, este tópico teve o intuito de exemplificar a dificuldade encontrada pelo autor em realizar uma comparação fidedigna dos resultados, seja por distinção na amostra, no método de extração ou mesmo no cultivar da planta. Assim, o que se depreende da discussão é que cada amostra de resíduo de processamento de soja deve ser analisada em particular (e, portanto, reafirma-se a importância de um método de quantificação validado), para que seja aferida a viabilidade de utilizá-la como fonte alternativa de isoflavonas. Logo, para tomar essa decisão de maneira mais embasada, outras ferramentas devem ser utilizadas para sustentá-la, como será discutido na próxima seção.

4.5 - Fatores sustentáveis das extrações

De posse dos rendimentos de extração de cada experimento, foi possível determinar a massa de analito extraída e, com isso, foi possível calcular os FS, que se apresentam como razões entre as quantidades de recursos aplicados (tempo, energia, volume de solvente e massa de solvente) e a referida massa.

Todas as eficiências de uso de recursos dos experimentos realizados foram calculadas e podem ser averiguadas no *APÊNDICE D*. A *TABELA 4.9* exhibe as eficiências dos experimentos que possuem o maior rendimento de extração ressaltados na *SEÇÃO 4.3*. Os valores tanto para DAI quanto pra GEN apresentaram as mesmas tendências, que serão apontadas a seguir.

TABELA 4.9 - Fatores sustentáveis para os experimentos com maior rendimento de cada técnica e planejamento aplicado.

Equipamento, planejamento	Exp.	Fator sustentável							
		Energia (kJ mg ⁻¹)		Tempo de extração (h mg ⁻¹)		Volume de solvente (L mg ⁻¹)		Massa de amostra (g mg ⁻¹)	
		DAI	GEN	DAI	GEN	DAI	GEN	DAI	GEN
Homogeneizador, fatorial fracionário	2	656	1051	1,46	2,34	0,09	0,14	8,75	14,02
Homogeneizador, composto central	4	1001	1610	2,22	3,58	0,11	0,18	11,12	17,89
Ultrassom, fatorial completo	7	500	781	0,12	0,19	1,98	3,10	11,90	18,59
Ultrassom, composto central	4	385	673	0,05	0,10	1,53	2,67	7,11	12,41

Fonte: Elaboração própria.

A contraposição desses valores com os de outros experimentos tornou evidente que as melhores extrações, no que concerne o rendimento de extração, não necessariamente correspondem aos menores valores de uso de recursos por uma mesma quantidade de massa de analito extraída. Dessa maneira, selecionou-se os experimentos com os melhores resultados de eficiência de uso de recursos, que estão mostrados na *TABELA 4.10*.

TABELA 4.10 - Valores dos fatores sustentáveis para os experimentos mais eficientes de cada técnica e planejamento estudado.

Técnica, planejamento	Exp.	Fator sustentável							
		Energia (kJ mg ⁻¹)		Tempo de extração (h mg ⁻¹)		Volume de solvente (L mg ⁻¹)		Massa de amostra (g mg ⁻¹)	
		DAI	GEN	DAI	GEN	DAI	GEN	DAI	GEN
Homogeneizador, fatorial fracionário	3	286	466	0,63	1,04	0,05	0,08	9,52	15,54
Homogeneizador, composto central	6	769	1256	1,71	2,79	0,09	0,14	11,56	18,89
Ultrassom, fatorial completo	7	500	781	1,98	3,10	0,12	0,19	11,90	18,59
Ultrassom, composto central	10	248	407	0,98	1,62	0,05	0,08	7,38	12,12

Fonte: Elaboração própria.

Desses novos experimentos selecionados, comparações entre os resultados mostram que para o PFF utilizando homogeneizador, o experimento 3 com relação ao 2 apresenta uma eficiência de extração 10% menor, mas também menores uso de energia ($\approx 56\%$), tempo de extração ($\approx 56\%$) e volume de solvente ($\approx 45\%$) para a extração de mesma quantidade dos analitos. No que diz respeito ao PCC utilizando-se desse mesmo equipamento, o experimento 6, se comparado ao 4, possui rendimento 4% menor⁷, porém menores uso de energia ($\approx 23\%$), tempo de extração ($\approx 22\%$) e volume de solvente ($\approx 23\%$). Para o PFC utilizando banho ultrassônico, o experimento 7 se mostrou o mais vantajoso no que tange rendimento e eficiência. Das extrações feitas pelo PCC efetuadas com esse equipamento depreende-se que o experimento 10, apesar de apresentar eficiência

⁷ O autor entende que essa comparação não deve ser feita para esse conjunto específico de dados devido ao desvio padrão calculado evidenciar que, estatisticamente, os rendimentos são idênticos. Entretanto, como essa é uma métrica elaborada pelo grupo de pesquisa ao qual ele pertence, optou-se por mostrar todos os raciocínios e argumentos construídos para a utilização da métrica.

de extração 4% menor⁸, utiliza $\approx 38\%$ menos energia, $\approx 38\%$ menos tempo para extração e 13% menos volume de solvente.

Sendo assim, a aplicação da métrica “fatores sustentáveis” evidencia que não é suficiente notar apenas os rendimentos de extração mais expressivos para escolher as melhores condições do procedimento. Em alguns casos, cabe avaliar se experimentos com eficiência de extração menores podem apresentar uma aplicação de recursos para extração mais eficiente e, por consequência, custo operacional menor.

A eficiência mássica, ou eficiência relacionada à massa de amostra empregada, não foi discutida anteriormente pois consiste na inversão matemática dos rendimentos de extração amplamente discutidos e, portanto, apresenta as mesmas relações já expostas. Entretanto, esse conjunto de dados ainda figura como parte dos fatores sustentáveis e é importante, pois traz consigo uma visão dos resultados mais assimilável à lógica comercial de larga escala.

Por exemplo, discute-se a utilização de isoflavonas como suplementar ao alívio dos efeitos da menopausa. A farmacopeia brasileira indica que as cápsulas utilizadas para esse fim devem conter de 70 a 150 mg de extrato seco da semente de soja contendo no mínimo 40% de isoflavonas totais (ANVISA, 2018). Tomando por base uma cápsula contendo 100 mg de isoflavonas totais, seriam necessários 460 g (para o banho ultrassônico) ou 600 g (para o homogeneizador) de biomassa residual para produção da mesma cápsula contendo apenas GEN e DAI, que são as formas mais bioativas desses compostos e, portanto, apresentam maior bioatividade e funcionalidade para a atenuação do climatério (PABICH e MATERSKA, 2019).

O raciocínio anterior considera os experimentos com melhores eficiências mássicas e pode ser efetuado através de cálculos simples de proporção tomando os valores de eficiência de massa de amostra obtidos da aplicação da métrica em estudo. Importante lembrar que, apesar da ordem de centenas de

⁸ Idem *ITEM 7*.

gramas de biomassa necessários para fabricação da cápsula, esse material residual é gerado em quantidades expressivas, logo, é bastante disponível, ao contrário das sementes que são utilizadas tanto pelo setor pecuário (ração), como pelo alimentício (óleo de soja e proteína a base de soja) e da agricultura (plantio).

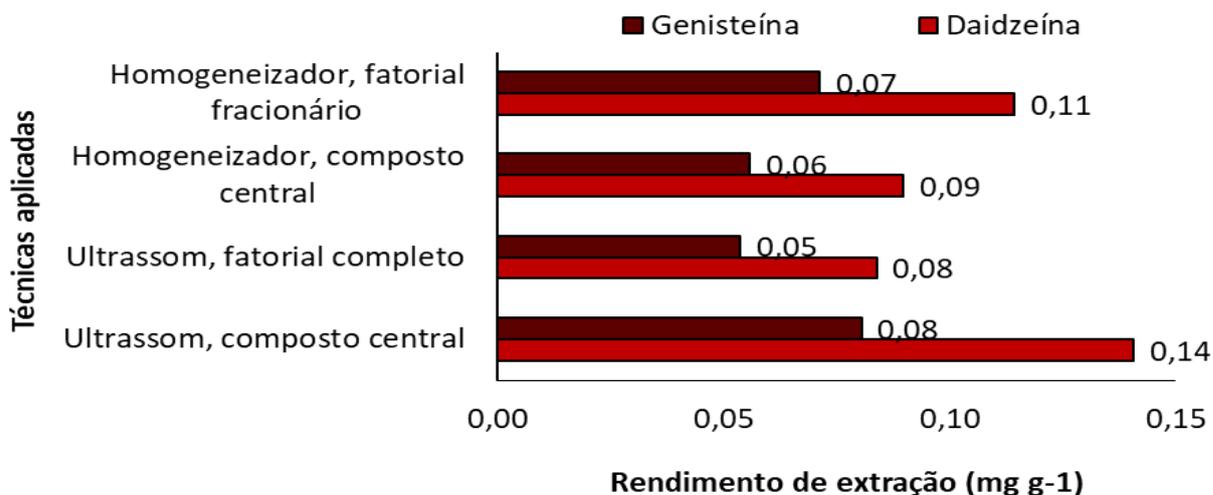
4.6 - Comparação das técnicas

Nesta seção será abordada a comparação dos resultados obtidos no estudo com relação aos procedimentos de extração considerando rendimento de extração e fatores sustentáveis.

4.6.1 - Comparação entre os rendimentos de extração das técnicas aplicadas

Para a comparação do desempenho das técnicas e planejamentos, uma representação gráfica foi elaborada e está presente na *FIGURA 4.12*. Levando os dois analitos em consideração, o PFF apresentou maior rendimento para a EAH enquanto que o extrato obtido pela EAU com maior concentração dos compostos foi resultante do PCC.

FIGURA 4.12 - Melhores resultados baseados em rendimentos de extração para os dois procedimentos de extração aplicados e os respectivos planejamentos realizados.



Fonte: Elaboração própria.

O banho ultrassônico proporcionou rendimentos 23% e 13% maiores que o homogeneizador de alta velocidade para DAI e GEN, respectivamente. A escolha de uma ou outra técnica deve dar importância ao custo de aquisição dos equipamentos necessários e a outras especificidades relacionadas ao emprego dos procedimentos de extração, uma vez que o rendimento se mostrou comparável entre ambos. Cabe ressaltar que as otimizações ainda necessitam de finalização, o que pode alterar essas relações.

4.6.2 - Comparação dos fatores sustentáveis entre as técnicas estudadas

A TABELA 4.10 (SEÇÃO 4.5) mostra os melhores resultados de eficiência de uso de recursos em cada conjunto de experimentos considerando planejamento e técnica de extração. A EAU apresentou menor uso de energia (aproximadamente 87%) e de massa de amostra (por volta de 78%) do que a técnica com homogeneizador de alta velocidade para uma mesma massa dos analitos extraída. De maneira análoga, a EAH teve maior eficiência para o tempo

de extração e para o volume de solvente (cerca de 64% menor tempo e 96% menor uso de solvente) do que a realizada com banho ultrassônico. Conseqüentemente, a escolha de uma das técnicas deve levar em consideração o custo necessário para aplicá-las de acordo com localidade e outras especificidades de cada laboratório ou planta industrial, em um primeiro momento.

Como os valores discutidos estão atrelados ao rendimento de extração, espera-se que a futura otimização dos experimentos altere a relação descrita no parágrafo anterior. É possível observar também que as eficiências de uso de recurso são distintas, porém comparáveis para ambas as técnicas e, portanto, ambos os procedimentos de extração adotados apresentam potencial como técnicas ainda mais sustentáveis.

5 - Conclusão

Através deste trabalho foi possível desenvolver um método analítico verde e sustentável para extração e quantificação de duas isoflavonas agliconas, de resíduos agroindústrias da soja. Os resultados obtidos evidenciam que os resíduos de pré-limpeza podem ser fontes alternativas de moléculas bioativas e, portanto, os conceitos de biorrefinaria e economia circular podem ser aplicados nessa etapa da cadeia de produção de soja.

O método cromatográfico desenvolvido pode ser considerado seletivo (estando ausente o teste de pureza de picos), possui linearidade, apresentou limites de detecção e quantificação adequados e um resultado satisfatório no ensaio preliminar de recuperação. Ainda faltam outras figuras de mérito para que o método seja validado, porém, ele tem se mostrado promissor.

Quanto à otimização dos experimentos, foi possível concluir que, das variáveis estudadas, a razão amostra-solvente e a concentração de etanol em solução aquosa são as mais significativas para extração dos analitos estudados para ambas as técnicas. Ainda, com relação a EAU, o tempo se mostrou também uma variável importante. Contudo, as melhores condições ainda precisam ser avaliadas, pois os testes para refinamento dessas variáveis não obtiveram o êxito esperado. Mesmo assim, o maior rendimento obtido pela extração assistida por homogeneizador de alta velocidade foi de $0,114 \text{ mg g}^{-1}$ para daidzeína e $0,071 \text{ mg g}^{-1}$ para genisteína, enquanto que para a extração assistida por ultrassom foi de $0,140 \text{ mg g}^{-1}$ para daidzeína e $0,079 \text{ mg g}^{-1}$ para genisteína. Em luz disso, a técnica que utiliza o banho ultrassônico foi a mais eficiente para extração de isoflavonas.

As extrações foram conduzidas de maneira a seguir os princípios de química verde e o ideário da química sustentável, utilizando apenas solventes atóxicos, condições e técnicas brandas e apresentando uso consciente dos recursos empregados nos procedimentos experimentais, que foram avaliados com a aplicação da métricas “fatores sustentáveis”. Com isso, foi possível determinar

que os experimentos com maior rendimento não necessariamente são os mais eficientes com relação à quantidade de tempo, energia, volume de solvente e massa de amostra utilizadas, mostrando que é necessário ponderar outros aspectos experimentais para além da massa de analitos obtidas para determinar um método dito ótimo. Ainda, as técnicas estudadas apresentaram eficiências similares, tendo potencial como procedimentos sustentáveis.

Com a discussão da literatura, por fim, foi possível conjecturar que as particularidades que envolvem a planta e o processamento tornam específicos os resultados adquiridos, pois amostras similares vindas de soja de outro cultivar, plantada e colhida em outras condições e processada por diferentes mecanismos podem ou não apresentar conteúdo aproveitável de isoflavonas. Contudo, mesmo ainda não finalizado, este estudo somou mais uma evidência da presença de genisteína e daidzeína na biomassa gerada como resíduo agroindustrial, e conseqüentemente mais um passo para a viabilização da implementação da economia circular através do conceito de biorrefinaria na cadeia de produção de soja, um dos grãos mais consumidos do planeta.

REFERÊNCIAS

Alder, C. M.; Hayler, J. D.; Henderson, R. K.; Redman, A. M.; Shukla, L.; Shuster, L. E.; & Sneddon, H. F. “Updating and further expanding GSK’s Solvent Sustainability Guide”. *Green Chem.*, **18**: 3879, 2016.

ALI, N. “Soybean Processing and utilization”. IN: *The soybean: botany, production and uses*. SINGH, G. (ed.). 1a ed. Oxfordshire, CABI Publishing, 2010. p. 345-374.

AMORIM, M. L.; SOARES, J.; DOS REIS COIMBRA, J. S.; DE OLIVEIRA LEITE, M.; ALBINO, L. F. T. & MARTINS, M. A. “Microalgae proteins: production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed”. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, online, 1, 2020.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. “Primeiro Suplemento do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira”. 1a ed. Brasil, Ministério da Saúde, 2018.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. “Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria”. Brasil, Diário Oficial da União, 1999. Disponível em: <https://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MjI0OQ%2C%2C>. Acesso em: 23 mar. 2021.

APROSOJA BRASIL - Associação Brasileira dos Produtores de Soja. “Economia”. 2016. Disponível em: <https://aprosojabrasil.com.br/a-soja/economia/>. Acesso em: 23 mar. 2021.

ARAÚJO, D. J. C.; MACHADO, A. V. & VILARINHO, M. C. L. G. “Availability and suitability of agroindustrial residues as feedstock for cellulose-based materials: Brazil case study”. *Waste and Biomass Valorization*, 10 (10): 2863, 2019.

ARAÚJO, M. M.; FANARO, G. B. & VILLAVICENCIO, A. L. C. H. “Soybean and isoflavones - from farm to fork”. IN: *Soybean*. EL-SHEMY, H. A. (ed.). 1a ed. Rijeka, IntechOpen, 2013.

ATTARD, T. M.; CLARK, J. H. & MCELROY, C. R. “Recent developments in key biorefinery areas”. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, **21**: 64, 2020.

BARFI, B.; HADJMOHAMMADI, M. R. & KASAAI, M. R. “Determination of daidzein and genistein in soybean and its waste by matrix solid-phase dispersion

extraction and HPLC”. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, 140 (10): 1143, 2009.

BRASIL. Ministério da Cultura, pecuária e Abastecimento. “Guia de Validação e controle de qualidade analítica - fármacos em produtos para alimentação animal e medicamentos veterinários”. Brasília, Mapa/ACS, 2011. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/guia-de-validacao-controle-de-qualidade-analitica.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2021.

CALDEIRA, C.; VLYSIDIS, A.; FIORE, G.; DE LAURENTIIS, V.; VIGNALI, G. & SALA, S. “Sustainability of food waste biorefinery: a review on valorisation pathways, techno-economic constraints, and environmental assessment”. *Bioresour. Technol.*, **312**: 123, 2020.

CARNEIRO, A. M.; MOREIRA, E. A.; BRAGAGNOLO, F. S.; BORGES, M. S.; PILON, A. C.; RINALDO, D. & FUNARI, C. S. “Soya agricultural waste as a rich source of isoflavones”. *FOOD Res. Int.*, **130**: 108949, 2020.

CARVALHAL, R. C. “Rompimento celular: 1. Introdução”. 2016. Disponível em: <https://slideplayer.com.br/slide/8142164/>. Acesso em: 23 mar. 2021.

CASS, Q. B. & DEGANI, A. L. G. “Eluição gradiente”. IN: Desenvolvimento de métodos por HPLC Fundamentos, estratégias e validação. CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. 1a ed. São Carlos, Edufscar, 2012. p. 41-48.

CIELECKA-PIONTEK, J.; ZALEWSKI, P.; JELIŃSKA, A. & GARBACKI, P. “UHPLC: the greening face of liquid chromatography”. *Chromatographia*, 76 (21-22): 1429, 2013.

CLARK, J. H. “Green and sustainable chemistry: an introduction”. IN: Green and sustainable medicinal chemistry: methods, tools and strategies for the 21st century pharmaceutical industry. SUMMERTON, L.; SNEDDON, H. F.; JONES, L. C.; CLARK, J. H. (org.). 1a ed. [Online], The Royal Society of Chemistry, 2016. p. 1-11.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. “Acompanhamento da safra brasileira de grãos”. Brasília, Conab, 2020. Disponível em: https://www.conab.gov.br/component/k2/item/download/32932_bd1481aad9724985f6cd7d2ad9655cf2. Acesso em: 23 mar. 2021.

CORRÊA, A. G. & ZUIN, V. G. “Química Verde: Fundamentos E Aplicações”. 1a ed, São Carlos, Edufscar, 2012.

DE PRETTO, C.; GIORDANO, R. DE L. C.; TARDIOLI, P. W. & COSTA, C. B. B. “Possibilities for producing energy, fuels, and chemicals from soybean: a biorefinery concept”. *Waste and Biomass Valorization*, 9 (10): 1703, 2018.

DUROVIC, S.; NIKOLIC, B.; LUKOVIC, N.; JOVANOVIC, J.; STEFANOVIC, A.; SEKULJICA, N.; MIJIN, D. & KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. “The impact of high-power ultrasound and microwave on the phenolic acid profile and antioxidant activity of the extract from yellow soybean seeds”. *Ind. Crops Prod.*, **122**: 223, 2018.

EBIKADE, E.; ATHALEY, A.; FISHER, B.; YANG, K.; WU, C.; IERAPETRITOU, M. G. & VLACHOS, D. G. “The future is garbage: repurposing of food waste to an integrated biorefinery”. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 8 (22): 8124, 2020.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. “Soja em números (safra 2019/20)”. Embrapa Soja. 2020. Dados econômicos. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acesso em: 23 mar. 2021.

FAHMI, R.; KHODAIYAN, F.; POURAHMAD, R. & EMAM-DJOMEH, Z. “Effect of ultrasound assisted extraction upon the genistin and daidzin contents of resultant soymilk”. *J. Food Sci. Technol.*, 51 (10): 2857, 2014.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. “Crops”. FAOSTAT, 2018. Data. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 23 mar. 2021.

FORSTER-CARNEIRO, T.; BERNI, M. D.; DORILEO, I. L. & ROSTAGNO, M. A. “Biorefinery study of availability of agriculture residues and wastes for integrated biorefineries in Brazil”. *Resour. Conserv. Recycl.*, **77**: 78, 2013.

FRANCISCHINI, D. S.; LOPES, A. P.; SEGATTO, M. L.; STAHL, A. M. & ZUIN, V. G. “Development and application of green and sustainable analytical methods for flavonoid extraction from *Passiflora* waste”. *BMC Chem.*, 14 (1): 56, 2020.

GAMA, M. R.; MELCHERT, W. R.; PAIXAO, T. R. L. C. & ROCHA, F. R. P. “an overview of the brazilian contributions to green analytical chemistry”. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 91 (1), 2019.

GASPARETTO, J. C.; SMOLAREK, F. S. F.; DE FRANCISCO, T. M. G.; MIRANDA, L. C.; PONTAROLO, R. & SIQUEIRA, P. F. “Development and validation of an HPLC-DAD method for analysis of the six major isoflavones in extracts from soybean processing”. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 89 (7): 1211, 2012.

GOGATE, P. R. & PANDIT, A. B. “Application of cavitational reactors for cell disruption for recovery of intracellular enzymes”. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 83 (8): 1083, 2008.

GOULD, K. S. & LISTER, C. “Flavonoid functions in plant”. IN: *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. ANDERSEN, Ø. M.; MARKHAM, K. R. (ed.). 1a ed. Nova Iorque, Taylor & Francis, 2006. p. 397-443.

GÜNERKEN, E.; D’HONDT, E.; EPPINK, M. H. M.; GARCIA-GONZALEZ, L.; ELST, K. & WIJFFELS, R. H. “Cell disruption for microalgae biorefineries”. *Biotechnol. Adv.*, 33 (2): 243, 2015.

HIGDON, J.; DRAKE, V. J.; DELAGE, B. & DUNCAN, A. M. “Soy isoflavones”. Oregon State University, 2016. Micronutrient Information Center. Disponível em: <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/soy-isoflavones#reference17>. Acesso em: 22 mar. 2021.

HOECK, J. A.; FEHR, W. R.; MURPHY, P. A. & WELKE, G. A. “Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean”. *Crop Sci.*, 40 (1): 48, 2000.

ICH - International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. “Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)”. *Int. Conf. Harmon.* 2005.

“ISOFLAVONES Market by Source (Soy, Red Clover), Application (Pharmaceuticals, Nutraceuticals, Cosmetics, and Food & Beverages), Form (Powder and Liquid), and Region (North America, Europe, Asia Pacific, RoW) - Global Forecast to 2025”. *Markets and Markets*, nov. 2019. Isoflavones Market. Disponível em: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/isoflavones-market-161667005.html>. Acesso em: 22 mar. 2021.

IKA. “T 10 basic ULTRA-TURRAX®”. 2021. Disponível em: <https://www.ika.com/en/Products-Lab-Eq/Dispersers-Homogenizer-csp-177/T-10-basic-ULTRA-TURRAX-cpdt-3737000/>. Acesso em: 18 set. 2021.

ISLAM, S. M.; ARYASOMAYAJULA, A. & SELVAGANAPATHY, P. R. “A review on macroscale and microscale cell lysis methods”. *Micromachines*, 8 (3): 83, 2017.

JIANMING, W.; YUAN, G.; PING, L.; FENG, H. & LIYING, L. “Optimization of ultrasound-assisted extraction procedure to determine total isoflavones in chinese soybean cheese by box-behnken design”. *Food Anal. Methods*, 6 (1): 221, 2013.

JIMÉNEZ-CASTRO, M. P.; BULLER, L. S.; SGANZERLA, W. G. & FORSTER-CARNEIRO, T. “Bioenergy production from orange industrial waste: a case study”. *Biofuels, Bioprod. Biorefining*, 14 (6): 1239, 2020.

JULIANO, V. F. “Curva de adição de padrão versus curva analítica”. 2015. Disponível em: <http://zeus.qui.ufmg.br/~valmir/index.php/2015/08/18/adicaoxcurva/>. Acesso em: 23 mar. 2021.

KLEJDUS, B.; MIKELOVÁ, R.; PETRLOVÁ, J.; POTĚŠIL, D.; ADAM, V.; STIBOROVÁ, M.; HODEK, P.; VACEK, J.; KIZEK, R. & KUBÁŇ, V. “Evaluation of isoflavone aglycon and glycoside distribution in soy plants and soybeans by fast column high-performance liquid chromatography coupled with a diode-array detector”. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (15): 5848, 2005.

KŘÍŽOVÁ, L.; DADÁKOVÁ, K.; KAŠPAROVSKÁ, J. & KAŠPAROVSKÝ, T. “Isoflavones.” *Molecules*, 24 (6): 1076, 2019.

KÜMMERER, K. “Sustainable chemistry: a future guiding principle”. *Angew. Chemie Int. Ed.*, 56 (52): 16420, 2017.

KÜMMERER, K.; CLARK, J. H. & ZUIN, V. G. “Rethinking chemistry for a circular economy”. *Science*, 367 (6476): 369, 2020.

LANTE, A.; BARION, G.; ZANNONI, S.; PASTORE, M. R.; TINELLO, F.; DAL CORTIVO, C.; VAMERALI, T. & MOSCA, G. “An ecofriendly procedure to extract isoflavones from soybean seeds”. *J. Clean. Prod.*, **170**: 1102, 2018.

LE, X. T.; VI, V. L. L.; TOAN, T. Q.; BACH, L. G.; TRUC, T. T. & HA, P. T. H. “Extraction process of polyphenols from soybean (*Glycine max* L.) sprouts: optimization and evaluation of antioxidant activity”. *Processes*, 7 (8): 489, 2019.

LEE, M. J.; CHUNG I.-M.; KIM, H & JUNG, M. Y. “High resolution LC–ESI-TOF-mass spectrometry method for fast separation, identification, and quantification of 12 isoflavones in soybeans and soybean products”. *Food Chem.*, **176**: 154, 2015.

LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F. & SILVEIRA, C. da C. ““Green chemistry”: os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa.” *Quim. Nova*, 26 (1): 123, 2003.

MALDANER, L. & JARDIM, I. C. S. F. “O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência”. *Quim. Nova*, 32 (1): 214, 2009.

MERCOSUL - Mercado Comum do Sul. “Farmacopeia MERCOSUL: cromatografia”. 2015. Disponível em: http://www.anmat.gob.ar/webanmat/mercosur/acta_1-15/P_Res_xx_15_Cromatografia_PT.pdf. Acesso em: 23 mar. 2021.

MS - MINISTÉRIO DA SAÚDE & ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. “Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017”. Brasil, Diário Oficial da União, 2017. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acesso em: 18 set. 2021.

NILE, S. H.; NILE, A.; OH, J.-W. & KAI, G. “Soybean processing waste: potential antioxidant, cytotoxic and enzyme inhibitory activities”. *Food Biosci.*, **38**: 100778, 2020.

PABICH, M. & MATERSKA, M. “Biological effect of soy isoflavones in the prevention of civilization diseases”. *Nutrients*, 11 (7): 1660, 2019.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. DA S. & REYES, F. G. R. “Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos”. *Quim. Nova*, 31 (5): 1190, 2008.

PEREIRA, F. M. V. & PEREIRA-FILHO, E. R. “Aplicação de programa computacional livre em planejamento de experimentos: um tutorial”. *Quim. Nova*, 41 (9): 1061, 2018.

PEREIRA-FILHO, E. R. “Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados”. 1a ed. São Carlos, Edufscar, 2016.

PESSOA, F. L. P.; VILLARDI, H.; CALIXTO, E. E. S.; VIEIRA, É. D.; SOUZA, A. L. B. & MACHADO, B. A. S. “Integrated Soybean Biorefinery”. IN: *Biorefinery Concepts [Working Title]*. BESCHKOV, V. (ed.). 1. ed. [Online], IntechOpen, 2019. p. 349-390.

PFALTZGRAFF, L.; DE BRUYN, M.; COOPER, E.; BUDARIN, V. & CLARK, J. “Food waste biomass: a resource for high-value chemicals”. *Green Chem.*, 15 (2): 307, 2013.

PICÓ, Y. “Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples”. *TrAC Trends Anal. Chem.*, **43**: 84, 2013.

RAGHUVANSHI, R. S. & BISHT, K. “Uses of soybean: production and preparation”. IN: *The soybean: botany, production and uses*. SINGH, G. (ed.). 1a ed. Oxfordshire, CABI Publishing, 2010. p. 404-426.

RAMIN, L. Z. “Estudos de resíduos agroindustriais brasileiros como fonte de compostos de alto valor agregado: métodos verdes para a extração de

flavonoides derivados de resíduos de laranja”. 1a ed. São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 2017.

REKOW, L. “Socio-ecological implications of soy in the brazilian cerrado”. *Challenges Sustain.*, 7 (1): 7, 2019.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. & MELO, L. F. C. “Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos”. *Quim. Nova*, 27 (5): 771, 2004.

RIBEIRO, M. G. T. C.; COSTA, D. A. & MACHADO, A. A. S. C. “Uma métrica gráfica para avaliação holística da verdura de reações laboratoriais - ‘Estrela Verde’.” *Quim. Nova*, 33 (3): 759, 2010.

ROSSI, R. C. “Empresas que aprendem e inovam: estudo de caso da valoração de resíduo agroindustrial proveniente da soja na Coplacana com foco em frações proteicas por meio de método analítico verde”. São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 2019.

ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M. & BARROSO, C. G. “Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones”. *J. Chromatogr. A*, 1012 (2): 119, 2003.

SEO, W. D.; KANG, J. E.; CHOI, S.-W.; LEE, K.-S.; LEE, M.-J.; PARK, K.-D. & LEE, J. H. “Comparison of nutritional components (isoflavone, protein, oil, and fatty acid) and antioxidant properties at the growth stage of different parts of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]”. *Food Sci. Biotechnol.*, 26 (2): 339, 2017.

SHELDON, R. A. “Metrics of green chemistry and sustainability: past, present, and future”. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 6 (1): 32, 2018.

SHEN, D.; WU, Q.; SCIARAPPA, W. J. & SIMON, J. E. “Chromatographic fingerprints and quantitative analysis of isoflavones in tofu-type soybeans”. *Food Chem.*, 130 (4): 1003, 2012.

ŠIBUL, F.; ORČIĆ, D.; VASIĆ, M.; ANAČKOV, G.; NAĐPAL, J.; SAVIĆ, A. & MIMICA-DUKIĆ, N. “Phenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory potential of herb and root extracts of seven selected legumes”. *Ind. Crops Prod.*, **83**: 641, 2016.

SORIA, A. C. & VILLAMIEL, M. “Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review”. *Trends Food Sci. Technol.*, 21 (7): 323, 2010.

STRIEDER, M. L. & BERTAGNOLLI, P. F. “A soja no sistema de cultivo”. Embrapa, 12 jan. 2016. Notícias. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/8901995/artigo---a-soja-no-sistema-de-cultivo>. Acesso em: 23 mar. 2021.

- TEÓFILO, R. F. & FERREIRA, M. M. C. “Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial”. *Quim. Nova*, 29 (2): 338, 2006.
- TRAN, T. N. T.; CHEW, K. W.; BUI, X. V.; NGUYEN, T. D. P.; LE, T. T. A.; TRUONG, T. M. H. & SHOW, P. L. “Optimization of isoflavones extraction from soybeans using full factorial design”. *J. Food Process. Preserv.*, 43 (9), 2019.
- UNIQUE. “Modelo: USC - 1400 / Família USC-1400A / USC-1450A - Linha Compacta”. 2021. Disponível em: <http://unique.ind.br/usc1400.html>. Acesso em: 18 set. 2021.
- WU, Q.; WANG, M.; SCIARAPPA, W. J. & SIMON, J. E. “LC/UV/ESI-MS Analysis of isoflavones in edamame and tofu soybeans”. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (10): 2763, 2004.
- XU, L.; LAMB, K.; LAYTON, L. & KUMAR, A. “A membrane-based process for recovering isoflavones from a waste stream of soy processing”. *Food Res. Int.*, 37 (9): 867, 2004.
- YANG, Z.; ZHU, W.; GAO, S.; XU, H.; WU, B.; KULKARNI, K.; SINGH, R.; TANG, L. & HU, M. “Simultaneous determination of genistein and its four phase II metabolites in blood by a sensitive and robust UPLC-MS/MS method: application to an oral bioavailability study of genistein in mice.” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 53 (1): 81, 2010.
- YOSHIARA, L. Y.; MADEIRA, T. B.; DELAROZA, F.; DA SILVA, J. B. & IDA, E. I. “Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-centroid mixture design”. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 63 (8): 978, 2012.
- ZAHEER, K. & AKHTAR, M. H. “An updated review of dietary isoflavones: nutrition, processing, bioavailability and impacts on human health”. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 57 (6): 1280, 2017.
- ZHANG, Q.-W.; LIN, L.-G. & YE, W.-C. “Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review”. *Chin. Med.*, 13 (1): 20, 2018a.
- ZHANG, Z.; POOJARY, M. M.; CHOUDHARY, A.; RAI, D. K. & TIWARI, B. K. “Comparison of selected clean and green extraction technologies for biomolecules from apple pomace”. *Electrophoresis*, 39 (15): 1934, 2018b.

ZUIN, V. G. “Green sample preparation of complex matrices: towards sustainable separations of organic compounds based on the biorefinery concept”. *Pure Appl. Chem.*, 88 (1-2): 29, 2016.

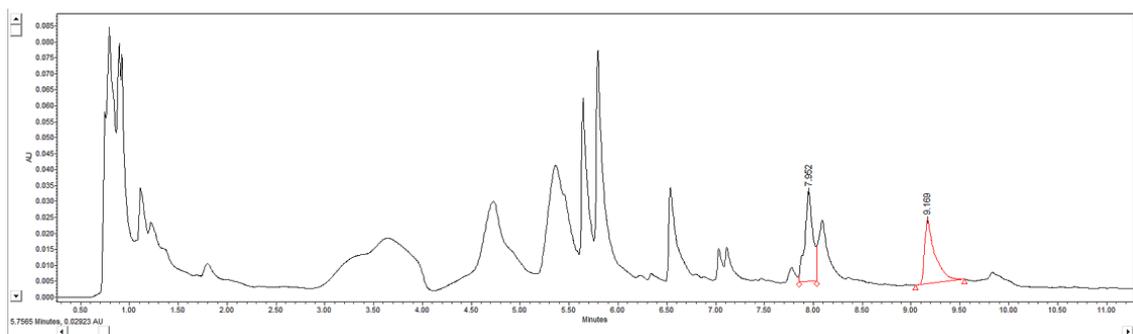
ZUIN, V. G.; RAMIN, L. Z.; SEGATTO, M. L.; STAHL, A. M.; ZANOTTI, K.; FORIM, M. R.; SILVA, M. F. D. G. F. & FERNANDES, J. B. “To separate or not to separate: what is necessary and enough for a green and sustainable extraction of bioactive compounds from Brazilian citrus waste”. *Pure Appl. Chem.*, 93 (1): 13, 2020a.

ZUIN, V. G.; SEGATTO, M. L.; ZANDONAI, D. P.; GROSSELI, G. M.; STAHL, A.; ZANOTTI, K. & ANDRADE, R. S. “Integrating green and sustainable chemistry into undergraduate teaching laboratories: closing and assessing the loop on the basis of a citrus biorefinery approach for the biocircular economy in Brazil”. *J. Chem. Educ.*, 96 (12): 2975. 2019.

ZUIN, V.; SEGATTO, M. L. & ZANOTTI, K. “Towards a green and sustainable fruit waste valorisation model in Brazil: optimisation of homogenizer-assisted extraction of bioactive compounds from mango waste using a response surface methodology”. *Pure Appl. Chem.*, 92 (4): 617, 2020b.

APÊNDICE A - Métodos cromatográficos empregados

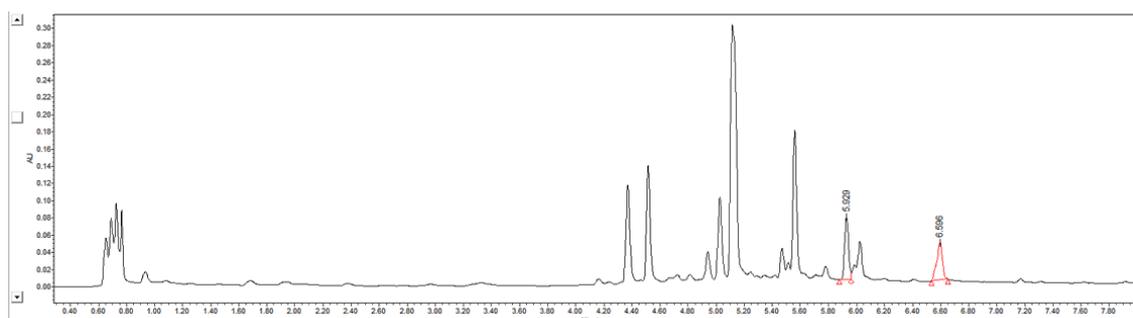
CROMATOGRAMA 1 - Fase estacionária: coluna Acquity HSS C18 (dimensões: 2,1x100 mm; tamanho da partícula: 1,8 µm).



Tempo (min)	% Água ultrapura	% Acetonitrila
0	90	10
2	90	10
17	0	100

Temperatura da coluna (°C)	Volume de injeção (µL)	Fluxo de fase móvel (mL min ⁻¹)
35	1	0,3

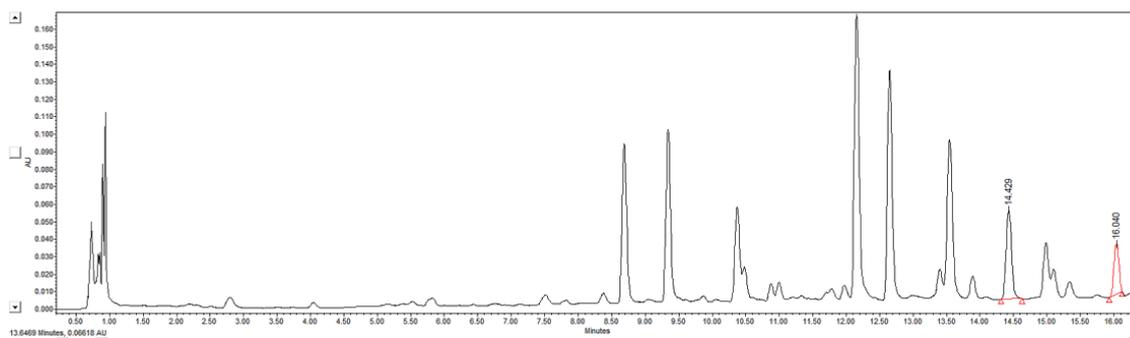
CROMATOGRAMA 2 - Fase estacionária: coluna Acquity BEH C8 (dimensões: 2,1 x 50 mm; tamanho de partícula: 1,7 µm).



Tempo (min)	% Água ultrapura acidificada (0,1% ácido fórmico)	% Acetonitrila
0	90	10
2	90	10
12	0	100

Temperatura da coluna (°C)	Volume de injeção (µL)	Fluxo de fase móvel (mL min ⁻¹)
35	1	0,4

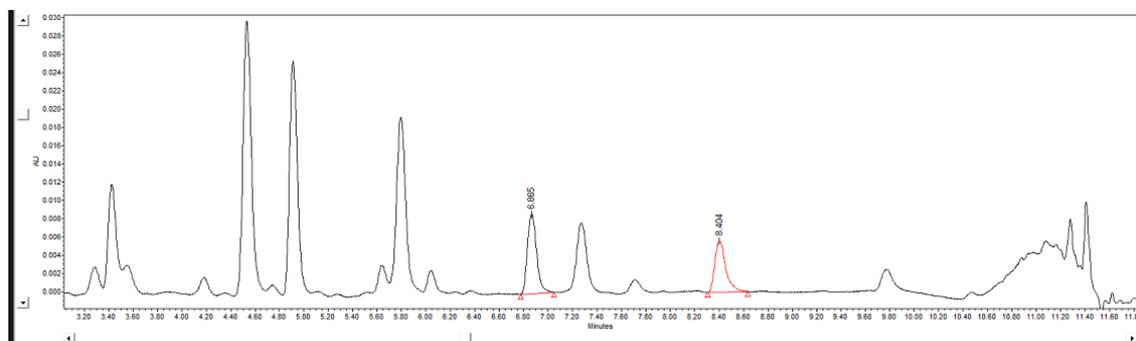
CROMATOGRAMA 3 - Fase estacionária: coluna Acquity BEH C8 (dimensões: 2,1 x 50 mm; tamanho de partícula: 1,7 µm).



Tempo (min)	% Água ultrapura acidificada (0,1% ácido fórmico)	% Metanol
0	90	10
2	90	10
17	50	50
18	0	100

Temperatura da coluna (°C)	Volume de injeção (µL)	Fluxo de fase móvel (mL min ⁻¹)
35	1	0,4

CROMATOGRAMA 4 - Fase estacionária: coluna Acquity BEH C8 (dimensões: 2,1 x 50 mm; tamanho de partícula: 1,7 µm).



Tempo (min)	% Água ultrapura acidificada (0,1% ácido fórmico)	% Metanol
0	75	25
9	50	50
10	0	100
Temperatura da coluna (°C)	Volume de injeção (µL)	Fluxo de fase móvel (mL min⁻¹)
35	1	0,4

APÊNDICE B - Concentração dos analitos em cada ponto da curva analítica e área do pico correspondente no cromatograma

Curva analítica preparada com os analitos na presença de metanol (curva no solvente)							
Ponto da curva	Concentração real de Daidzeína	Área do pico de Daidzeína	Média da área dos picos para Daidzeína (\pm Desvio Padrão Amostral)	Ponto da curva	Concentração real de Genisteína	Área do pico de Genisteína	Média da área dos picos para Genisteína (\pm Desvio Padrão Amostral)
1	1,04	9.468 9.841 10.894	10.068 (\pm 740)	1	1,04	9.602 9.626 11.326	10.185 (\pm 988)
2	5,20	61.108 61.701 62.346	61.718 (\pm 619)	2	5,20	70.436 71.657 71.873	71.322 (\pm 775)
3	10,40	125.773 127.926 134.136	129.278 (\pm 4.342)	3	10,40	148.429 152.344 160.597	153.790 (\pm 6.212)
4	26,00	310.922 327.789 332.115	323.609 (\pm 11.198)	4	26,00	381.129 399.870 405.821	395.607 (\pm 12.886)
5	52,00	616.413 626.503 632.584	625.167 (\pm 8.168)	5	1,04	775.395 794.538 797.374	789.102 (\pm 11.955)

Curva analítica preparada com os analitos na presença do extrato (curva na matriz)							
Ponto da curva	Concentração real de Daidzeína	Área do pico de Daidzeína	Média da área dos picos para Daidzeína (\pm Desvio Padrão Amostral)	Ponto da curva	Concentração real de Genisteína	Área do pico de Genisteína	Média da área dos picos para Genisteína (\pm Desvio Padrão Amostral)
0	0	41.449 44.864 47.228	44.514 (\pm 2.905)	0	0	29.232 32.319 34.170	31.907 (\pm 2.495)
1	1,04	53.068 58.128 62.016	57.737 (\pm 4.487)	1	1,01	43.092 47.510 50.125	46.909 (\pm 3.555)
2	5,20	97.500 101.581 107.125	102.069 (\pm 4.831)	2	5,05	92.548 95.753 101.617	96.639 (\pm 4.599)
3	10,40	161.396 164.628 166.933	164.319 (\pm 2.781)	3	10,10	163.658 164.769 168.824	165.750 (\pm 2.719)
4	15,60	211.388 222.354 224.276	219.339 (\pm 6.953)	4	15,15	217.830 229.165 230.681	225.892 (\pm 7.023)
5	52,00	555.990 623.361 692.147	623.833 (\pm 68.080)	5	50,50	614.494 689.869 766.605	690.323 (\pm 76.057)

APENDICE C - Análise de variância para as regressões

Tabela ANOVA - Daidzeína em metanol (curva no solvente)					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	754.923.838.318	754.923.838.318	12.927	7,07688E-21
Resíduo	13	759.178.545	58.398.350		
Total	14	755.683.016.863			

Tabela ANOVA - Genisteína em metanol (curva no solvente)					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1.214.180.733.147	1.214.180.733.147	20.905	3,11856E-22
Resíduo	13	755.040.977	58.080.075		
Total	14	1.214.935.774.124			

Tabela ANOVA - Daidzeína em extrato (curva na matriz)					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	705.752.356.647	705.752.356.647	1.186	1,95029E-16
Resíduo	16	9.523.027.715	595.189.232		
Total	17	715.275.384.362			

Tabela ANOVA - Genisteína em extrato (curva na matriz)					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	912.193.360.675	912.193.360.675	1.234	1,42237E-16
Resíduo	16	11.826.605.069	739.162.817		
Total	17	924.019.965.745			

SQ: Soma Quadrática; MQ: Média Quadrática; gl: Graus de liberdade.

APENDICE D - Áreas dos picos para cada planejamento e técnica

Áreas dos picos para os extratos produzidos no conjunto de experimentos racionalizado pelo planejamento fatorial fracionário utilizando homogeneizador de alta velocidade.

Exp.	Variável normalizada				Área do pico respectivo ao analito	
	Composição do solvente	Tempo	Razão Amostra-Solvente	Velocidade de rotação	Daidzeína	Genisteína
1	1	1	-1	-1	123.746	92.844
2	1	1	1	1	98.669	43.843
3	1	-1	-1	1	255.083	191.203
4	1	-1	1	-1	261.639	190.491
5	-1	1	-1	1	129.056	51.665
6	-1	1	1	-1	139.456	103.353
7	-1	-1	-1	-1	133.529	70.974
8	-1	-1	1	1	166.331	72.577

Áreas dos picos para os extratos produzidos no conjunto de experimentos racionalizado pelo planejamento composto central utilizando homogeneizador de alta velocidade.

Exp.	Variável normalizada		Média das áreas dos picos respectivos ao analito	
	Razão Amostra-Solvente	Composição do solvente	Daidzeína	Genisteína
1	$-\sqrt{2}$	0	50.839	35.867
2*	$\sqrt{2}$	0	132.449	97.416
3*	0	$-\sqrt{2}$	101.107	71.353
4	0	$\sqrt{2}$	109.952	79.695
5*	1	-1	126.377	86.961
6	1	1	142.634	103.723
7	-1	1	63.225	47.282
8*	-1	-1	68.957	46.292
9	0	0	101.972	73.759
10	0	0	90.665	65.652
11	0	0	108.212	83.011

*As áreas não correspondem à médias para esses experimentos pois as análises apresentaram erro.

Áreas dos picos para os extratos produzidos no conjunto de experimentos racionalizado pelo planejamento fatorial completo utilizando ultrassom.

Exp.	Variável normalizada			Área do pico respectivo ao analito	
	Frequência	Tempo	Composição do solvente	Daidzeína	Genisteína
1	1	1	1	72.146	54.433
2	1	1	-1	71.533	45.093
3	1	-1	1	78.249	59.753
4	1	-1	-1	85.937	57.984
5	-1	1	1	80.290	58.624
6	-1	1	-1	64.664	43.252
7	-1	-1	1	102.822	76.451
8	-1	-1	-1	66.943	43.014

Áreas dos picos para os extratos produzidos no conjunto de experimentos racionalizado pelo planejamento de composto central utilizando ultrassom.

Exp.	Variável normalizada			Área do pico respectivo ao analito	
	Razão Amostra-Solvente	Tempo	Composição do solvente	Daidzeína	Genisteína
1*	-1	-0,68 **	-1	75.776	60.387
2	1	-0,68	-1	154.981	119.628
3	-1	1	-1	114.670	83.560
4	1	1	-1	221.858	154.165
5	-1	-0,68	1	64.819	53.804
6	1	-0,68	1	84.175	66.954
7	-1	1	1	96.052	70.245
8	1	1	1	119.522	93.668
9*	-1,68	0	0	33.360	25.437
10	1,68	0	0	246.753	183.710
11	0	-1,68	0	120.126	94.124
12	0	1,68	0	111.478	84.853
13	0	0	-1,68	154.338	107.776
14	0	0	1,68	124.044	95.186
15	0	0	0	170.181	114.936
16	0	0	0	156.230	112.663
17	0	0	0	156.647	115.473

*Os valores das áreas dos picos correspondem as médias de duplicatas feitas para esses experimentos.

**Por um erro, os experimentos com variável 2 em nível -1 foram efetuados em nível -0,68.

APÊNDICE E - Fatores Sustentáveis para cada planejamento e técnica

Fatores sustentáveis para o planejamento fatorial fracionário utilizando homogeneizador de alta velocidade.

Exp.	Rendimento (mg g ⁻¹)		Fator sustentável							
			Energia (kJ mg ⁻¹)		Tempo de extração (h mg ⁻¹)		Volume de solvente (L mg ⁻¹)		Massa de amostra (g mg ⁻¹)	
	DAI	GEN	DAI	GEN	DAI	GEN	DAI	GEN	DAI	GEN
1	0,108	0,064	696	1.170	1,55	2,60	0,05	0,08	9,28	15,60
2	0,114	0,071	656	1.051	1,46	2,34	0,09	0,14	8,75	14,02
3	0,105	0,064	286	466	0,63	1,04	0,05	0,08	9,52	15,54
4	0,101	0,064	296	465	0,66	1,03	0,10	0,16	9,87	15,51
5	0,053	0,019	1.419	3.989	3,15	8,86	0,09	0,27	18,92	53,19
6	0,081	0,032	931	2.308	2,07	5,13	0,12	0,31	12,41	30,77
7	0,068	0,026	439	1.171	0,98	2,60	0,07	0,20	14,64	39,02
8	0,109	0,050	274	598	0,61	1,33	0,09	0,20	9,14	19,92

Fatores sustentáveis para o planejamento de composto central utilizando homogeneizador de alta velocidade.

Exp.	Rendimento (mg g ⁻¹)		Fator sustentável							
			Energia (kJ mg ⁻¹)		Tempo de extração (h mg ⁻¹)		Volume de solvente (L mg ⁻¹)		Massa de amostra (g mg ⁻¹)	
	DAI	GEN	DAI	GEN	DAI	GEN	DAI	GEN	DAI	GEN
1	0,082	0,055	2.197	3.298	4,88	7,33	0,24	0,37	12,20	18,32
2	0,072	0,045	829	1.334	1,84	2,96	0,09	0,15	13,82	22,23
3	0,083	0,050	1.090	1.784	2,42	3,96	0,12	0,20	12,11	19,82
4	0,090	0,056	1.001	1.610	2,22	3,58	0,11	0,18	11,12	17,89
5	0,077	0,045	868	1.482	1,93	3,29	0,10	0,16	13,06	22,29
6	0,087	0,053	769	1.256	1,71	2,79	0,09	0,14	11,56	18,89
7	0,079	0,054	1.761	2.597	3,91	5,77	0,20	0,29	12,65	18,65
8	0,086	0,053	1.612	2.646	3,58	5,88	0,18	0,29	11,58	19,01
9	0,083	0,052	1.080	1.730	2,40	3,84	0,12	0,19	12,00	19,22
10	0,074	0,047	1.217	1.926	2,70	4,28	0,14	0,21	13,52	21,40
11	0,088	0,058	1.017	1.550	2,26	3,44	0,11	0,17	11,30	17,22

Fatores sustentáveis para o planejamento fatorial completo utilizando ultrassom.

Exp.	Rendimento (mg g ⁻¹)		Fator sustentável							
			Energia (kJ mg ⁻¹)		Tempo de extração (h mg ⁻¹)		Volume de solvente (L mg ⁻¹)		Massa de amostra (g mg ⁻¹)	
	DAI	GEN	DAI	GEN	DAI	GEN	DAI	GEN	DAI	GEN
1	0,059	0,039	19.200	3.276	0,17	0,25	11,37	16,92	17,06	25,37
2	0,058	0,033	19.200	3.304	0,17	0,30	11,47	20,01	17,21	30,02
3	0,064	0,043	4.800	754	0,16	0,23	2,62	3,89	15,71	23,32
4	0,070	0,042	4.800	685	0,14	0,24	2,38	3,99	14,28	23,97
5	0,065	0,042	2.571	3.986	0,15	0,24	10,20	15,82	15,30	23,73
6	0,052	0,032	3.205	5.232	0,19	0,31	12,72	20,76	19,08	31,14
7	0,084	0,054	500	781	0,12	0,19	1,98	3,10	11,90	18,59
8	0,054	0,032	773	1.314	0,18	0,31	3,07	5,22	18,41	31,29

Fatores sustentáveis para o planejamento de composto central utilizando ultrassom.

Exp.	Rendimento (mg g ⁻¹)		Fator sustentável							
			Energia (kJ mg ⁻¹)		Tempo de extração (h mg ⁻¹)		Volume de solvente (L mg ⁻¹)		Massa de amostra (g mg ⁻¹)	
	DAI	GEN	DAI	GEN	DAI	GEN	DAI	GEN	DAI	GEN
1	0,088	0,062	597	849	0,16	0,23	2,37	3,37	11,40	16,23
2	0,098	0,063	289	449	0,08	0,12	1,15	1,78	10,20	15,83
3	0,134	0,083	750	1.205	0,11	0,17	2,98	4,78	7,49	12,03
4	0,141	0,081	385	673	0,05	0,10	1,53	2,67	7,11	12,41
5	0,075	0,055	700	943	0,19	0,26	2,78	3,74	13,37	18,02
6	0,053	0,037	536	773	0,15	0,21	2,13	3,07	18,92	27,26
7	0,112	0,071	898	1.415	0,13	0,20	3,56	5,62	8,96	14,13
8	0,075	0,050	719	1.082	0,10	0,15	2,85	4,30	13,26	19,95
9	0,054	0,041	1.861	2.451	0,37	0,49	7,39	9,72	18,47	24,31
10	0,135	0,083	248	407	0,05	0,08	0,98	1,62	7,38	12,12
11	0,098	0,065	171	257	0,10	0,15	0,68	1,02	10,17	15,31
12	0,091	0,059	921	1.417	0,11	0,17	3,66	5,62	10,97	16,87
13	0,127	0,074	398	679	0,08	0,13	1,58	2,69	7,89	13,47
14	0,102	0,066	496	763	0,10	0,15	1,97	3,03	9,84	15,15
15	0,140	0,079	361	639	0,07	0,13	1,43	2,53	7,15	12,67
16	0,128	0,077	393	651	0,08	0,13	1,56	2,58	7,80	12,92
17	0,129	0,079	392	636	0,08	0,13	1,56	2,52	7,78	12,62

DAI: daidzeína; GEN: genisteína.