

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

**Reaproveitamento de resíduos agroindustriais de frutas
obtidos por meio de manejo convencional e orgânico:
estudo de métodos para a extração verde e sustentável de
compostos bioativos**

Mateus Lodi Segatto*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTOR EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA
ANALÍTICA

Orientadora: Profa. Dra. Vânia G. Zuin Zeidler
Co-orientador: Prof. Dr. Moacir Rossi Forim

*** bolsista FAPESP**

São Carlos - SP
2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Mateus Lodi Segatto, realizada em 31/03/2022.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim (UFSCar)

Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho (UFSCar)

Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha (UFSCar)

Prof. Dr. Pedro Takao Yamamoto (ESALQ/USP)

Profa. Dra. Renata Colombo (USP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

*Dedico este trabalho à minha família,
Jerusa, Ângelo, Nina e Stella,
por serem a parte mais importante da
minha vida.*

Agradecimentos

Aproveito este espaço para agradecer a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Primeiramente, agradeço à Prof^a. Vânia pela orientação, conselhos, confiança e pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa, com tantas pessoas incríveis. Adiciono também um agradecimento pela acolhida, literalmente, quando todas as portas se fecharam para mim em um país estrangeiro em um momento de pandemia global. Por isso serei eternamente grato.

Ao Prof. Moacir pela co-orientação, parceria e todos os auxílios e conselhos dados quando mais foi necessário.

Ao Prof. Klaus Kümmerer, por me receber em sua universidade na Alemanha e me fazer sentir em casa, mesmo no meio de uma pandemia global. Também à Lena Schnarr, pesquisadora parceira em parte dos trabalhos realizados na Alemanha, por toda sua ajuda e contribuição durante o meu período na Leuphana.

À minha companheira, Stella, que leva o rótulo ao pé da letra e está ao meu lado em todos os momentos nos últimos 11 anos, com muita força, carinho e amor, sem os quais eu não conseguiria terminar este trabalho.

À minha família, meus pais Jerusa e Ângelo e minha irmã Nina, que sempre estão presentes para mim, acreditando na minha força e me apoiando de todas as maneiras possíveis. Estendo o agradecimento também ao meu padrao Jeferson, minha madrastra Leda, meus irmãos agregados, meus primos, tios e avós. Sem eles eu não estaria aqui também.

Aos meus colegas de laboratório e de vida, especialmente Aylon e Karine, cujas discussões sempre me levam a lugares novos, pelos auxílios nos trabalhos e parcerias sempre frutíferas. À Dorai, que sempre esteve presente nos momentos mais necessários no laboratório. Também a todos os colegas que passaram pelos grupos de pesquisa GPQV e PNSC e estiveram presentes de alguma forma, meus agradecimentos.

Aos meus amigos de São Carlos, pelos bons momentos vividos nestes últimos 5 anos, em especial à Evelyn, Ben, Rosivânia, Luize, Higor, João, Danielle, Domingos, Ana Paula e Amanda.

À Universidade Federal de São Carlos, ao departamento de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ/UFSCar) pela oportunidade de estudar, pesquisar e realizar este doutorado. Aos professores do programa, especialmente ao Prof. Edenir pelos auxílios em quimiometria e por ceder as rotinas de cálculo de regressão polinomial. Ao CNPq e à FAPESP (2018/11409-0), pelas bolsas de doutorado e doutorado direto concedidas e à CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche na Alemanha.

Meus sinceros agradecimentos.

Lista de tabelas

TABELA 3.1 – Variáveis utilizadas na extração de resíduos de processamento de manga utilizando a técnica por EAH-EtOH.....	42
TABELA 3.2 – Planejamento fatorial BBD para a otimização da extração de resíduos de processamento de manga utilizando a técnica por EAH-EtOH.	43
TABELA 3.3 – Variáveis estudadas para a extração de resíduos de processamento de manga por EAM.....	43
TABELA 3.4 – Planejamento fatorial <i>Box-Behnken</i> para a extração de resíduos de processamento de manga utilizando EAM.	45
TABELA 3.5 – Variáveis estudadas para a extração por DMFS.	46
TABELA 3.6 – Planejamento fatorial do tipo <i>Doehlert</i> duplicado para a extração de resíduos de processamento de manga utilizando DMFS.	47
TABELA 3.7 – Soluções selecionadas para o teste de triagem.	48
TABELA 3.8 – Variáveis estudadas para a otimização da extração por EAH-LIs utilizando [C ₈ MIm] Cl e Acetato de Colina.....	49
TABELA 3.9 – Planejamento fatorial de <i>Box-Behnken</i> para otimização da extração de EAH-LIs em resíduos de processamento de manga utilizando [C ₈ Mim] Cl como solvente.....	49
TABELA 3.10 – Variáveis estudadas para a otimização da extração por EAH-HCl com meio ácido para resíduo de goiaba.	56
TABELA 3.11 – Planejamento fatorial de face centrada para a otimização da extração de quercetina e vanilina utilizado EAH-HCl a partir de resíduos de processamento de goiaba.....	56
TABELA 3.12 – Variáveis estudadas para a extração de resíduos de processamento de goiaba por EAU-HCl.	58
TABELA 3.13 – Planejamento fatorial <i>Box-Behnken</i> para a extração de quercetina e vanilina de resíduos de processamento de goiaba utilizando EAU-HCl.	59
TABELA 3.14 – Solventes utilizados para testes de solubilidade de hesperidina, suas polaridades e classificações de acordo com o guia de solventes verdes <i>Chem21</i> . .	63

TABELA 3.15 – Composição do meio de cultura OECD.....	70
TABELA 3.16 – Tratamentos utilizados para determinação de mortalidade de insetos de lagarta de <i>H. armigera</i>	72
TABELA 3.17 – Tratamentos utilizados para avaliação da inibição de crescimento de lagartas de <i>H. armigera</i>	74
TABELA 3.18 – Tratamentos utilizados para determinação de mortalidade de insetos de percevejo-marrom (<i>E. heros</i>).	75
TABELA 3.19 – Tratamentos utilizados para a determinação de atividade fitotóxica dos extratos RPM e RPG contra a planta de soja (<i>Glycine max</i>)	76
TABELA 4.1 – Curvas analíticas e figuras de mérito relativas ao método cromatográfico para detecção e quantificação de mangiferina e hiperosídeo utilizado na extração EAH-EtOH.	83
TABELA 4.2 – Curvas analíticas e figuras de mérito relativas ao método cromatográfico para detecção e quantificação de mangiferina e hiperosídeo nas extrações DMFS, EAM e demais ensaios.	87
TABELA 4.3 – Ensaio de recuperação e erros intra- e inter-diários realizados para as extrações de DMFS e EAM.	88
TABELA 4.4 – Curvas analíticas de mangiferina e hiperosídeo utilizadas na metodologia de extração EAH-LIs e seus limites de detecção e quantificação.	90
TABELA 4.5 – Planejamento fatorial de <i>Box-Behnken</i> para o método EAH-EtOH e respectivas respostas de mangiferina e hiperosídeo.....	91
TABELA 4.6 – Planejamento fatorial <i>Box-Behnken</i> para o método EAM e as respectivas respostas de mangiferina, hiperosídeo e da função desejabilidade.	95
TABELA 4.7 – Planejamento fatorial <i>Doehlert</i> duplicado para o método DMFS e as respectivas respostas de mangiferina, hiperosídeo e da função desejabilidade. ...	100
TABELA 4.8 – Planejamento fatorial <i>Box-Behnken</i> utilizando o método EAH-LIs e as respectivas respostas de mangiferina e hiperosídeo para os LIs [C ₈ MIm] Cl e acetato de colina.....	106
TABELA 4.9 – Equações das curvas analíticas, coeficiente de determinação e limites de detecção e de quantificação utilizados para os experimentos EAH-HCl.	114

TABELA 4.10 – Equações das curvas analíticas, coeficiente de determinação e limites de detecção e de quantificação utilizados para os experimentos EAU-HCl.	118
TABELA 4.11 – Planejamento fatorial de face centrada e as respostas de quercetina e vanilina de acordo com método EAH-HCl	119
TABELA 4.12 – Planejamento fatorial <i>Box-Behnken</i> para o método EAU-HCl e as respectivas respostas de quercetina e vanilina.	124
TABELA 4.13 – Equações das curvas analíticas, coeficiente de determinação e limites de detecção e de quantificação utilizados para os experimentos realizados com resíduos de laranja.	132
TABELA 4.14 – Pontuações dadas aos solventes selecionados no teste empírico de solubilidade, seus respectivos parâmetros de solubilidade de Hansen e valores calculados de RED.	133
TABELA 4.15 – Valores de R_a obtidos em diferentes misturas selecionadas (menores valores de R_a) e suas composições otimizadas.	135
TABELA 4.16 – Recorte dos solventes com menores valor de RED após teste de solubilidade com misturas binárias e ternárias e novo cálculo dos HSPs empíricos da hesperidina e raio da esfera de Hansen.	136
TABELA 4.17 – Estabilidade do extrato de manga em acetato de colina após armazenamento em -20°C	139
TABELA 4.18 – Inferências estatísticas de acordo com o teste de Kurskal-Wallis para o primeiro ensaio de atividade inseticida com a lagarta de <i>H. armigera</i>	142
TABELA 4.19 – Mortalidade acumulada (%) de lagartas de <i>H. armigera</i> expostas a diferentes inseticidas via <i>diet overlay</i>	142
TABELA 4.20 – Inferências estatísticas de acordo com o teste de Kurskal-Wallis para o ensaio de atividade inseticida e de inibição de crescimento com a lagarta de <i>H. armigera</i>	145
TABELA 4.21 – Mortalidade acumulada (%) de lagartas de <i>H. armigera</i> expostas a diferentes inseticidas via <i>diet overlay</i> no ensaio de mortalidade e inibição de crescimento.	145

TABELA 4.22 – Parâmetros morfológicos de lagartas de <i>H. armigera</i> expostas a diferentes soluções de extrato, solvente e controle via <i>diet overlay</i>	147
TABELA 4.23 – Inferências estatísticas de acordo com o teste de Kurskal-Wallis para o ensaio de atividade inseticida com ninfas de <i>E. heros</i>	149
TABELA 4.24 – Mortalidade acumulada (%) de ninfas de <i>E. heros</i> expostas a diferentes inseticidas via oral e ingestão, concomitantemente.	150
TABELA 4.25 – Valores médios das notas aplicadas (0 a 4) às plantas de soja com lesões de fitotoxicidade causadas por diferentes tratamentos botânicos.	151
TABELA 4.26 – Frequência de plantas de soja classificadas em cada escala de nota de fitotoxicidade causadas por diferentes tratamentos botânicos.	151

Lista de figuras

FIGURA 1.1 – Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da ONU (Agenda 2030)..	3
FIGURA 1.2 – Representação da célula vegetal e as três etapas que ocorrem nas extrações sólido-líquido.....	10
FIGURA 1.3 – Representação do mecanismo de extração em matrizes vegetais por EAM.....	15
FIGURA 1.4 – Procedimento de extração por DMFS.....	16
FIGURA 1.5 – Representação do mecanismo de extração da EAU em matrizes vegetais.....	18
FIGURA 1.6 – Estudo de caso de biorrefinaria para frutas de manga.....	20
FIGURA 1.7 – Principais bioativos encontrados nos resíduos de manga.....	20
FIGURA 1.8 – Principais compostos fenólicos bioativos encontrados nos resíduos de goiaba.....	23
FIGURA 1.9 – Principais compostos bioativos presentes nos resíduos de laranja...	25
FIGURA 3.1 – Caracterização das amostras de resíduo de processamento de manga (RPM/IO).....	32
FIGURA 3.2 – Caracterização das amostras de resíduo de processamento de manga RPM/LC-E a partir da fruta <i>in natura</i>	34
FIGURA 3.3 – Equipamento de extração por EAH em procedimento de extração de resíduo de processamento de manga.....	42
FIGURA 3.4 – Sistema de extração por DMFS para extrato de manga.....	46
FIGURA 3.5 – Caracterização das amostras de resíduo de processamento de goiaba RPG/LO a partir da fruta <i>in natura</i>	52
FIGURA 3.6 – Caracterização das amostras de resíduo de processamento de goiaba RPG/LC-L a partir da fruta <i>in natura</i>	53
FIGURA 3.7 – Ensaio de solubilidade para determinação empírica dos parâmetros de Hansen.....	62
FIGURA 3.8 – Unidade experimental do ensaio de atividade inseticida com <i>H. armigera</i>	73

FIGURA 3.9 – Unidade experimental do ensaio de atividade inseticida com <i>E. heros</i>	75
FIGURA 4.1 – Cromatogramas de extrato proveniente de extração assistida por homogeneizador (A) e de solução padrão de mangiferina e hiperosídeo (B).....	79
FIGURA 4.2 – Perfil de absorção UV da banda cromatográfica de mangiferina em solução padrão (A) e em extrato de resíduo de manga (B). Pureza de banda para mangiferina em extrato de resíduo de manga de acordo com o perfil UV em três diferentes pontos da banda (C).	81
FIGURA 4.3 – Perfil de absorção UV da banda de hiperosídeo em solução padrão (A) e em extrato de resíduo de manga (B). Pureza de banda para mangiferina em extrato de resíduo de manga de acordo com o perfil UV em três diferentes pontos da banda (C).....	81
FIGURA 4.4 – Cromatogramas de extrato de manga obtido a partir do método EAH-EtOH (A) e o mesmo extrato fortificado com 50 mg L ⁻¹ de mangiferina e hiperosídeo (B).....	82
FIGURA 4.5 – Curvas analíticas utilizadas na quantificação de mangiferina e hiperosídeo dos experimentos obtidos nos ensaios de EAH-EtOH.....	83
FIGURA 4.6 – Cromatogramas das soluções padrão de mangiferina e hiperosídeo (A) e extratos proveniente de extração DMFS (B) e EAM (C).	85
FIGURA 4.7 – Cromatogramas de extrato de manga obtidos a partir do método DMFS (A) e o mesmo extrato fortificado com 100 mg L ⁻¹ de mangiferina e hiperosídeo (B).....	85
FIGURA 4.8 – Perfil UV das bandas de hiperosídeo (A) e mangiferina (B) encontrados em solução padrão de 100 mg L ⁻¹ (vermelho) e nos extratos obtidos pelos métodos de DMFS (verde) e EAM (azul).	86
FIGURA 4.9 – Pureza de banda determinada pelo perfil UV de mangiferina (A, B) e hiperosídeo (C, D) em três diferentes tempos de retenção das respectivas bandas cromatográficas dos extratos obtidos a partir da extração por EAM e DMFS.	86
FIGURA 4.10 – Curvas analíticas utilizadas na quantificação de mangiferina e hiperosídeo dos experimentos obtidos nos ensaios de DMFS, EAM e demais ensaios.....	87

FIGURA 4.11 – Sobreposição de cromatogramas (350 nm) de padrões analíticos de mangiferina e hiperosídeo (em preto) e extratos obtidos a partir de diversos solventes, de acordo com método EAH-LIs.....	89
FIGURA 4.12 – Perfil de absorção UV das bandas de mangiferina (A) e hiperosídeo (B) em solução dos padrões e no extrato obtido a partir do método EAH-LIs ([C ₈ MIm] Cl).....	89
FIGURA 4.13 – Metodologia de superfície de resposta para a extração por EAH-EtOH de mangiferina.....	91
FIGURA 4.14 – Metodologia de superfície de resposta para a extração por EAH-EtOH de hiperosídeo.....	92
FIGURA 4.15 – Metodologia de superfície de resposta para a extração por EAM de mangiferina.....	96
FIGURA 4.16 – Metodologia de superfície de resposta para a extração por EAM de hiperosídeo.....	97
FIGURA 4.17 – Metodologia de superfície de resposta para a extração por EAM de acordo com a função de desejabilidade.	98
FIGURA 4.18 – Metodologia de superfície de resposta para a extração por DMFS de acordo com as respostas de mangiferina (A) e hiperosídeo (B).....	101
FIGURA 4.19 – Metodologia de superfície de resposta para a extração por DMFS de acordo com as respostas da função de desejabilidade.	103
FIGURA 4.20 – Resultado do ensaio de triagem dos líquidos iônicos (EAH-LIs) para a extração de mangiferina e hiperosídeo a partir de resíduo de processamento de manga.....	104
FIGURA 4.21 – Metodologia de superfície de resposta para o método EAH-LIs para as extrações de mangiferina (coluna A) e hiperosídeo (coluna B) utilizando o LI [C ₈ MIm] Cl como solvente.	107
FIGURA 4.22 – Metodologia de superfície de resposta para o método EAH-LIs para as extrações de mangiferina (coluna A) e hiperosídeo (coluna B) utilizando o LI acetato de colina como solvente.	108

FIGURA 4.23 – Comparação entre melhores experimentos de extração com o método EAH e suas eficiências de extração de mangiferina e hiperosídeo.....	110
FIGURA 4.24 – Resultados de eficiência de extração de mangiferina e hiperosídeo a partir da amostra de resíduo de manga (RPM/LC) seca em estufa e liofilizador....	111
FIGURA 4.25 – Cromatogramas exploratórios das amostras de resíduo de manga obtidas a partir de secagem com estufa (preto) e com liofilizador (vermelho), registrados em comprimentos de onda de 254 (A), 280 (B) e 350 nm (C).	111
FIGURA 4.26 – Resultados comparativos da eficiência de extração de mangiferina e hiperosídeo a partir das diferentes amostras de resíduo de manga: processamento industrial de manga orgânica (RPM/IO), processamento laboratorial de manga convencional (RPM/LC) e orgânica (RPM/LO).	112
FIGURA 4.27 – Cromatogramas exploratórios das diferentes amostras de resíduo de manga (<i>Mangifera indica</i> var. Palmer) obtidas a partir de processamento industrial de manga orgânica (RPM/IO - azul), processamento laboratorial de manga convencional (RPM/LC - vermelho) e orgânica (RPM/LO - preto) nos comprimentos de onda de 254 (A), 280 (B) e 350 nm (C).	113
FIGURA 4.28 – Cromatogramas da solução padrão de quercetina e vanilina (azul) e extratos proveniente de extração EAU-HCl (preto), registrados em 280 (A) e 370 nm (B).....	115
FIGURA 4.29 – Comparação de cromatogramas de extrato de goiaba obtidos a partir do método EAU-HCl e o mesmo extrato fortificado com vanilina detectado a 280 nm (A) e quercetina detectado em 370 nm (B).....	116
FIGURA 4.30 – Perfil UV das bandas cromatográficas de vanilina (A) e quercetina (B) encontradas em solução padrão de 100 mg L ⁻¹ (vermelho) e no extrato obtido pelo método EAU-HCl (azul).	117
FIGURA 4.31 – Pureza de banda determinada pelo perfil UV de vanilina (A) e quercetina (B) em três diferentes tempos de retenção das respectivas bandas cromatográficas do extrato obtido a partir da extração por EAU-HCl.	117
FIGURA 4.32 – Metodologia de superfície de resposta para a extração de quercetina (A) e vanilina (B) de acordo com o método EAH-HCl.....	120

FIGURA 4.33 – Estudo temporal da extração ácida de quercetina (A) e vanilina (B) com soluções aquosas de etanol (70%): sem ácido (azul claro), com HCl (azul escuro), ácido cítrico (amarelo), ácido ascórbico (laranja) e ácido acético (verde).	121
FIGURA 4.34 – Cromatogramas comparativos entre extratos obtidos a partir de resíduo de goiaba em solvente etanólico sem (vermelho) e com a presença de HCl 1M (preto), registrados em 280 (A) e 370 nm (B).	122
FIGURA 4.35 – Metodologia de superfície de resposta para a otimização da extração de quercetina a partir de resíduo de goiaba utilizando o método EAU-HCl.....	125
FIGURA 4.36 – Metodologia de superfície de resposta para a otimização da extração de vanilina a partir de resíduo de goiaba utilizando o método EAU-HCl	126
FIGURA 4.37 – Cromatogramas exploratórios das amostras de resíduo de goiaba obtidas a partir de secagem com estufa (em preto) e liofilizador (vermelho), em comprimentos de onda de 254 (A), 280 (B) e 370 nm (C).	128
FIGURA 4.38 – Resultados comparativos da eficiência de extração de quercetina e vanilina a partir de amostras secas em estufa e liofilizador.....	129
FIGURA 4.39 – Resultados comparativos da eficiência de extração de quercetina e vanilina a partir das diferentes amostras de resíduo de goiaba: processamento laboratorial de goiaba orgânica (RPG/LO), processamento laboratorial de goiaba convencional (RPG/LC).	129
FIGURA 4.40 – Cromatogramas exploratórios das diferentes amostras de resíduo de goiaba obtidas a partir de processamento laboratorial de goiaba orgânica (RPG/LO – vermelho) e processamento laboratorial de goiaba convencional (RPG/LC - preto) e orgânica (RPM/LO - preto) nos comprimentos de onda de 254 (A), 280 (B) e 370 (C) nm.....	130
FIGURA 4.41 – Cromatogramas do extrato de resíduo de laranja (A) e da solução padrão de hesperidina (B), registrados em 280 nm.....	131
FIGURA 4.42 – Perfil UV das bandas referentes à hesperidina em solução de padrão (vermelho) e no extrato de resíduo de laranja (azul) no espectro A. No espectro B, pureza de banda determinada pelo perfil UV de hesperidina em três diferentes tempos de retenção da banda cromatográfica do extrato de resíduo de laranja.....	132

FIGURA 4.43 – Esfera de solubilidade de Hansen obtida a partir do teste de solubilidade realizado com solventes puros.	134
FIGURA 4.44 – Resultados da eficiência de extração de hesperidina a partir de resíduo de laranja em diferentes solventes selecionados de acordo com os HSPs.....	137
FIGURA 4.45 – Correlação entre eficiência de extração de hesperidina em diferentes solventes e seus respectivos RED em relação à hesperidina.	138
FIGURA 4.46 – Cromatogramas do extrato de manga em etanol/água (70%) após extração (preto); descongelado após 6 meses armazenado em -20°C (verde); após esterilização (rosa); e armazenado em geladeira (4°C) após 3 meses do descongelamento (amarelo).....	140
FIGURA 4.47 – Curvas de inibição de crescimento vs. concentração dos padrões analíticos de mangiferina, hiperosídeo, mistura dos padrões 1:1 e extrato etanólico de resíduo de manga.....	140
FIGURA 4.48 – Mortalidade acumulada de lagartas de <i>H. armigera</i> expostas à dieta artificial coberta por solução inseticida.	143
FIGURA 4.49 – Inibição de crescimento causada pelo tratamento extrato de manga em larvas de <i>H. armigera</i> (A), em comparação ao tratamento com o respectivo solvente (B), ambos após 120 horas de exposição.	144
FIGURA 4.50 – Inibição percentual do diâmetro da cápsula cefálica de lagartas de <i>H. armigera</i> expostas a dieta artificial coberta por solução inseticida à base do extrato RPM em diferentes concentrações.....	147
FIGURA 4.51 – Inibição percentual do peso de lagartas de <i>Helicoverpa armigera</i> expostas a dieta artificial coberta por solução inseticida à base do extrato RPM em diferentes concentrações.....	148
FIGURA 4.52 – Mortalidade acumulada de ninfas de <i>E. heros</i> expostas a dieta natural e papel filtro impregnados em solução inseticida.	150
FIGURA 4.53 – Visão geral do bioensaio de efeito fitotóxico de compostos botânicos sobre plantas de soja.	152

Resumo

REAPROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS DE FRUTAS OBTIDOS POR MEIO DE MANEJO CONVENCIONAL E ORGÂNICO: ESTUDO DE MÉTODOS PARA A EXTRAÇÃO VERDE E SUSTENTÁVEL DE COMPOSTOS BIOATIVOS. No contexto brasileiro, a magnitude da produção agrícola e agroindustrial gera também preocupação com a quantidade de resíduos descartados por este setor. Estes resíduos são biomassas com importantes propriedades que podem ser aproveitadas em plataformas químicas integradas, as biorrefinarias, para a extração de uma gama de compostos de alto valor agregado. Isto se aplica notavelmente em modelos orgânicos de produção, cuja cultura além de ser considerada mais sustentável, também está comumente ligada à maior presença de flavonoides e outros metabólitos secundários que apresentam bioatividade. Neste contexto, este trabalho tem como objetivo central extrair, por meio de métodos verdes, os principais compostos bioativos de resíduos do processamento de diversos tipos de frutas originadas da agricultura convencional e orgânica do estado de São Paulo. Utilizando técnicas estatísticas de quimiometria no planejamento dos experimentos e na avaliação dos dados gerados, diferentes métodos de extração considerados mais sustentáveis foram testados e otimizados. Para as amostras de resíduo de processamento de manga (*Mangifera indica*) foram comparadas as técnicas de Extração Assistida por Homogeneização (EAH), Extração Assistida por Micro-ondas (EAM) e Dispersão de Matriz em Fase Sólida (DMFS), todas estas utilizando soluções aquosas de etanol como meio líquido, avaliando a eficiência de extração de mangiferina e hiperosídeo como respostas. Além disso, também foi testada e discutida a utilização de soluções aquosas de líquidos iônicos (LIs) como meio de extração. Já para as amostras provenientes de resíduos de processamento de goiaba (*Psidium guajava*), o foco se deu na melhoria do desempenho da extração de quercetina e vanilina com meio líquido etanólico acidificado (HCl), utilizando as técnicas EAH e Extração Assistida por Ultrassom (EAU). Como prova de conceito, também foi avaliada a utilização dos parâmetros de solubilidade de Hansen (HSP) para procura de melhores solventes e misturas de solventes que possibilitem um maior rendimento de extração de hesperidina a partir de cascas de laranja (*Citrus sinensis*). Todos os extratos foram analisados por cromatografia líquida e os compostos bioativos foram devidamente quantificados, de acordo com curvas analíticas obtidas com padrões comerciais. Para avaliação dos efeitos dos parâmetros que circundam cada tipo de extração, bem como a otimização destas variáveis em termos de eficiência de extração, a metodologia de superfície de resposta (RSM) foi utilizada. Por fim, ensaios de atividade biológica foram conduzidos para avaliação do uso das soluções etanólicas de resíduos de manga e goiaba como agentes ativos em formulações biocidas. Extratos de manga e padrões de mangiferina e hiperosídeo foram testados contra a microalga *Raphidocelis subcapitata*, enquanto extratos de manga e goiaba foram testados por sua atividade inseticida contra lagartas (fase larval) de *Helicoverpa armigera* e ninfas do percevejo-marrom (*Euschistus heros*). Para a avaliação da seletividade dos extratos como produtos inseticidas, ensaios de atividade fitotóxica em plantas de soja (*Glycine max*) também foram realizados.

Abstract

REUSE OF AGRO-INDUSTRIAL FRUIT PROCESSING RESIDUES FROM CONVENTIONAL AND ORGANIC AGRICULTURE: A STUDY OF GREEN AND SUSTAINABLE EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS. The magnitude of the Brazilian agricultural and agro industrial market impresses by its greatness, but it is also the cause of serious concerns regarding the amount of waste generated and how to handle such residues. This kind of material comprises several chemically-interesting fractions, some of which potentially carrying bioactive compounds that could add value to the process when extracted, integrating biomass-based chemical platforms (biorefineries) when allied to other products and processes. Notably, organic agricultural systems could be interesting feedstocks for biorefineries, as they are not only considered greener production models, but also because they are often linked to a higher presence of flavonoids and other secondary metabolites that have bioactive properties. The central objective of this work is to extract, through green methods, the main bioactive compounds from the processing waste of fruits from both conventional and organic agricultural systems produced in the state of São Paulo, Brazil. Chemometric tools were used on experimental design and data assessment to evaluate and optimize different green extraction methods. Considering mango (*Mangifera indica*) processing waste, Homogenizer-Assisted Extraction (HAE), Microwave-Assisted Extraction (MAE) and Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) were studied, tested and optimized using ethanol-water (ethanolic) mixtures as solvents and assessing the extraction yield of mangiferin and hyperoside as responses. The use of aqueous solutions of Ionic Liquids (ILs) was also tested and discussed as viable solvent alternatives. Regarding guava (*Psidium guajava*) processing waste samples, the study was focused on improving the extraction yield of quercetin and vanillin with acidic ethanolic solutions (HCl), using HAE and Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) techniques. Besides that, as a proof-of-concept, the use of Hansen Solubility Parameters (HSP) was assessed as a tool for the screening of solvents and mixtures of solvents that allow a higher extraction yield of hesperidin from orange peels (*Citrus sinensis*). All extracts were analyzed using liquid chromatography and the compounds were quantified using calibration curves obtained with commercially available analytical standards. Response Surface Methodology (RSM) was employed for the assessment of the parameters that affect each extraction technique, as well as the optimization of these variables in terms of the extraction yield. Lastly, biological activity assays were conducted to evaluate the potential use of the ethanolic extracts from mango and guava processing wastes as biocidal products. Mango extracts and mangiferin and hyperoside standards were tested against the microalgae *Raphidocelis subcapitata*, while both mango and guava extracts were assessed for their insecticidal activity against larvae of *Helicoverpa armigera* moth and nymphs of the neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*). In order to assess the selectivity of the extracts as a pesticidal product, phytotoxic assays were conducted on soybean plants (*Glycine max*).

Sumário

1 – Introdução	1
1.1 – Química Verde e Química Sustentável	2
1.1.1 – <i>Química Analítica Verde</i>	5
1.2 – A cadeia de alimentos no Brasil e seus resíduos	6
1.3 – Extrações sólido-líquido: separações verdes e sustentáveis e como otimizá-las	9
1.3.1 – <i>Solventes para extrações sólido-líquido</i>	11
1.3.2 – <i>Parâmetros de solubilidade Hansen (HSP)</i>	12
1.3.3 – <i>Extração Assistida por Homogeneizador (EAH)</i>	13
1.3.4 – <i>Extração Assistida por Micro-ondas (EAM)</i>	14
1.3.5 – <i>Extração por Dispersão de Matriz em Fase Sólida (DMFS)</i>	16
1.3.6 – <i>Extração Assistida por Ultrassom (EAU)</i>	17
1.4 – Resíduos de frutas tropicais brasileiras e seus potenciais	18
1.4.1 – <i>Manga (Mangifera indica)</i>	19
1.4.2 – <i>Goiaba (Psidium guajava)</i>	22
1.4.3 – <i>Laranja (Citrus sinensis)</i>	24
2 – Objetivos	27
3 – Metodologia	29
3.1 – Materiais e equipamentos	29
3.2 – Manga (Mangifera indica)	31
3.2.1 – <i>Obtenção e condicionamento de amostras de resíduos de processamento de manga</i>	31
3.2.2 – <i>Métodos cromatográficos, curvas analíticas e figuras de mérito</i>	35
3.2.3 – <i>Extrações e planejamentos fatoriais</i>	41
3.2.4 – <i>Comparação entre diferentes métodos de secagem</i>	50
3.2.5 – <i>Comparação entre diferentes amostras</i>	50
3.3 – Goiaba (Psidium guajava)	51
3.3.1 – <i>Obtenção e condicionamento de amostras de resíduos de processamento de goiaba</i>	51
3.3.2 – <i>Métodos cromatográficos, curvas analíticas e figuras de mérito</i>	53
3.3.3 – <i>Metodologias de extração e planejamentos fatoriais</i>	55
3.3.4 – <i>Comparação entre diferentes métodos de secagem</i>	59
3.3.5 – <i>Comparação entre diferentes amostras</i>	60
3.4 – Laranja (Citrus sinensis)	60
3.4.1 – <i>Obtenção e condicionamento das amostras</i>	60
3.4.2 – <i>Método cromatográfico e curva analítica</i>	61
3.4.3 – <i>Parâmetros de Hansen e teste de solubilidade</i>	61
3.4.4 – <i>Ensaio de extrações de solventes puros e misturas</i>	65

3.5 – Análises quimiométricas	65
3.5.1 – Codificação das variáveis.....	66
3.5.2 – Estimativa dos efeitos das variáveis.....	66
3.5.3 – Função desejabilidade.....	67
3.5.4 – Modelagem e metodologia de superfície de resposta.....	68
3.6 – Ensaio biológico	69
3.6.1 – Atividade algicida (<i>R. subcapitata</i>).....	69
3.6.2 – Atividade inseticida.....	71
3.6.3 – Atividade fitotóxica (<i>G. max</i>).....	76
4 – Resultados e discussão	79
4.1 – Manga (<i>Mangifera indica</i>)	79
4.1.1 – Métodos cromatográficos, curvas analíticas e figuras de mérito.....	79
4.1.2 – Extrações, planejamentos fatoriais e superfícies de resposta.....	90
4.1.3 – Comparação entre diferentes métodos de secagem.....	110
4.1.4 – Comparação entre diferentes amostras.....	112
4.2 – Goiaba (<i>Psidium guajava</i>)	114
4.2.1 – Métodos cromatográficos, curvas analíticas e figuras de mérito.....	114
4.2.2 – Extrações, planejamentos fatoriais e superfícies de resposta.....	118
4.2.3 – Comparação entre diferentes métodos de secagem.....	127
4.2.4 – Comparação entre diferentes amostras.....	129
4.3 – Laranja (<i>Citrus sinensis</i>)	131
4.3.1 – Método cromatográfico e curva analítica.....	131
4.3.2 – Parâmetros de Hansen e testes de solubilidade.....	133
4.3.3 – Extrações com solventes puros e misturas.....	136
4.4 – Ensaio biológico	138
4.4.1 – Atividade algicida (<i>R. subcapitata</i>).....	138
4.4.2 – Atividade inseticida.....	141
4.4.3 – Atividade fitotóxica (<i>G. max</i>).....	151
5 – Conclusões e perspectivas futuras	155
6 – Referências	159
Apêndice 1	183
Apêndice 2	191

1 – Introdução

As consequências da evolução da indústria química, há mais de um século, levaram ao paradigma ecológico que envolve a comunidade científica atualmente. O uso excessivo de recursos finitos e a negligência quanto aos impactos ambientais, toxicidade e geração de resíduos nos produtos e processos químicos causaram efeitos evidentes em um curto intervalo de tempo. Inicialmente, o papel protagonista da química analítica se deu na análise dos poluentes gerados por estes processos, importantes metodologias que geraram protocolos e leis para diminuição da geração das substâncias danosas¹. Para além disso, o desenvolvimento de métodos analíticos mais eficientes nos permite avaliar melhor como utilizar materiais mais complexos, como os produtos naturais. Estes materiais contêm substâncias de alto potencial químico, ainda pouco explorado, cuja síntese é feita pelas plantas ou micro-organismos de forma eficiente, renovável e natural². O uso dos resíduos agroindustriais resultantes do processamento de frutas e verduras para indústria de alimentos se dá, portanto, como uma oportunidade de reduzir a geração destes materiais, de alto custo de descarte para as empresas processadoras, além de explorar o potencial químico presentes nestas frações. Isso é particularmente importante para a América Latina, especialmente por sua alta biodiversidade e tradição agrícola³. A classe de compostos naturais dos flavonoides é um bom exemplo deste potencial químico, visto que são compostos encontrados em diversas plantas que demonstram atividade biológica (ou bioatividade), com uma ampla gama de possíveis aplicações⁴.

Todos os trabalhos citados no parágrafo anterior foram capítulos ou revisões publicados nos últimos 5 anos por nosso grupo de pesquisa, incluindo o autor desta tese, com aderência a este trabalho de pesquisa e que ajudaram na concepção do projeto, no desenvolvimento dos métodos e nas demais discussões. Os principais conceitos envolvidos no desenrolar da pesquisa de doutorado serão apresentados nas próximas sessões, se alimentando destes trabalhos e as discussões envolvidas na concepção dos mesmos.

1.1 – Química Verde e Química Sustentável

É praticamente unânime a direção dos estudos em variadas áreas para a análise e/ou a mudança da relação ser humano-natureza. Numa visão recursista desta relação, o desenvolvimento sustentável aparece como uma alternativa, um modelo econômico em que o desenvolvimento humano não se dissocia da conservação dos recursos naturais⁵. Já a Química Verde (QV) atua como potencializadora dos avanços tecnológicos, um dos pilares do desenvolvimento sustentável, que deve englobar aspectos mais amplos, como os sociais, econômicos, políticos e ambientais⁶. Um dos marcos da QV foi a criação de seus 12 princípios por Anastas & Warner em 1998⁷, ainda pouco materializados em toda a sua potência. Esta lista de orientações tem como meta a prevenção de resíduos, o uso de matérias primas renováveis e menos perigosas e outros tópicos que apresentam um viés de transformação nos produtos e processos químicos através, principalmente, de mudanças desde a sua concepção. Desde então muitos conceitos associados foram utilizados para descrevê-la sob diferentes ângulos, sendo que todos convergem em um objetivo maior voltado à redução de impactos de um produto, processo ou atividade laboratorial, demonstrando inclusive a viabilidade econômica deste modelo, que tem sido a principal diretriz com relação ao estabelecimento dos procedimentos mais verdes em diferentes escalas⁸.

Por outro lado, o uso dos princípios da QV acabou se limitando a seus doze pontos, implicando no desenvolvimento de processos químicos que atendem a alguns requisitos enquanto ignoram outros aspectos importantes para um futuro sustentável. Um exemplo é o desenvolvimento do plástico verde, polietileno produzido no Brasil a partir de cana-de-açúcar, substituindo a matéria-prima fóssil pela renovável. Enquanto o uso da biomassa de fato constitui um princípio “verde”, o produto final continua sendo de ineficiente recirculação⁹, e quando descartado continua levando de dezenas a milhares de anos para se degradar completamente no ambiente¹⁰ – implicando em efeitos ambientais e sociais globais. O conceito de Química Sustentável (QS), neste contexto, guia para observações mais holísticas dos produtos químicos, ao analisar multidisciplinarmente todas as etapas do ciclo de vida do processo e levar em consideração os diferentes atores e suas interações¹¹. A visão da QS sobre a problemática do plástico verde, por exemplo, envolve não apenas o material de origem, mas também os processos pelos quais ele passa, os riscos e

benefícios do produto, suas funções e serviços e, principalmente, a responsabilidade sobre a propriedade do material durante todo o seu ciclo de vida⁹. Desta forma, a QS remodela o conceito da QV de *benign by design*, que determina o desenvolvimento de produtos intrinsecamente verdes desde a sua concepção, e o extrapola para maiores dimensões, incentivando o *design* de produtos facilmente recirculáveis ou biodegradáveis após uso¹². Repensar as funções dos produtos e avaliar a suficiência dos processos, assegurando a sua simplicidade e levando em consideração a eficiência em diferentes termos além da quantidade de material produzido, são valores importantes dentro da QS para atingir os objetivos de desenvolvimento sustentável (Figura 1.1)¹³.



FIGURA 1.1 – Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da ONU (Agenda 2030). Fonte: ONU (2015)¹⁴.

Através dessa amplitude de visões, a QS aproxima a química aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU), que através de 17 pontos (Figura 1.1) visa estabelecer metas a serem cumpridas para redução de danos das ações antrópicas no planeta, materializadas pela Agenda 2030¹⁴. Ao analisar todo o ciclo de vida dos produtos químicos, é possível atuar em todos os ODS – por meio de uma visão ampla dos fluxos globais de materiais dos diferentes setores industriais – incluindo objetivos relacionados à erradicação da pobreza (ODS 1) e redução das desigualdades (ODS 10), que também devem ser levados em consideração no desenvolvimento de novos produtos, processos e serviços químicos.

A maior difusão da QV e da QS nos últimos anos se dá, em parte, por conta de um grande avanço mundial nas discussões de novas políticas de *zero waste*, como a atual movimentação pela introdução do modelo circular na economia. A ideia é que a economia linear, caracterizada pelo fluxo da matéria-prima até o resíduo, seja substituída por uma economia de cadeia fechada, onde o valor dos produtos, materiais e recursos são mantidos na economia pelo maior tempo possível, e a geração de resíduos é minimizada¹⁵. A economia circular favorece a utilização de matérias-primas renováveis e a eliminação da geração de resíduos, incentivando a reciclagem e reutilização dos produtos e subprodutos, quando possível. A estratégia é financeiramente vantajosa para a indústria, pois, ao dar um uso ao que ainda é considerado rejeito, aumenta o seu valor de mercado e reduz a dependência em recursos naturais ainda inexplorados¹⁶. O modelo se integrou perfeitamente à utilização de recursos biológicos, em oposição aos recursos fósseis, e alavancou os estudos na área de biorrefinaria¹⁷.

Por definição, biorrefinarias são plataformas que realizam a conversão de biomassa em biocombustíveis, energia e outros produtos químicos. Assim, utilizam materiais de fonte renovável, como resíduos da agroindústria, e agregam valor a estes ao extrair produtos de interesse comercial¹⁸. O termo “biomassa” foi inicialmente definido por seu valor energético, mas de acordo com o aumento do interesse por esse material, as definições também se modificaram. Em geral, é considerado qualquer material orgânico disponível de forma renovável¹⁹. São materiais com estrutura complexa que têm como principais componentes os carboidratos, lipídios e proteínas, que em seu processamento podem ser separados e/ou transformados em

uma vasta gama de produtos²⁰. Uma importante etapa no desenvolvimento de produtos a partir dessas matrizes complexas é a análise, identificação e quantificação destes compostos, através de métodos analíticos que também podem se beneficiar de práticas e tecnologias mais sustentáveis.

1.1.1 – Química Analítica Verde

A Química Analítica também faz parte do movimento para tornar processos e reagentes mais limpos. Esta mudança ocorre ao substituir os métodos tradicionais por outros que valorizem a segurança do operador, diminuam a geração de resíduos, minimizem o consumo energético e eliminem ou reduzam a utilização de substâncias químicas, como solventes e reagentes²¹. Assim, etapa por etapa, alguns métodos verdes podem ser utilizados para alcançar os objetivos propostos pela Química Analítica Verde^{1,22}. Estes envolvem técnicas aplicadas em todos os passos do método analítico, desde o desenho dos experimentos, análises em campo, passando por procedimentos alternativos para extração em preparo de amostras, separações, sistemas de fluxo e métricas comparativas entre diferentes procedimentos analíticos^{23,24}. O desenvolvimento e otimização de novas técnicas de preparo de amostras beneficia não somente a elaboração de futuros métodos analíticos, mas também a eficácia da extração de compostos de alto valor agregado a partir de matrizes complexas, cujas técnicas são de interesse para escalonamento em níveis industriais¹.

Neste contexto, para se aumentar o grau verde dos métodos analíticos se insere também a quimiometria, caracterizada pelo tratamento estatístico de dados originados de um sistema ou processo químico que atua, dentre diversas aplicações, no planejamento de experimentos e análise de resultados²⁵. O maior cuidado estatístico no desenvolvimento de métodos analíticos e na interpretação dos dados resulta em métodos mais robustos e confiáveis, facilitando a tomada de decisões, além de reduzir o número de procedimentos realizados. Isto também permite diminuir o uso de reagentes, consumo energético e tempo de uso dos equipamentos²⁶. Uma destas ferramentas é o planejamento fatorial, técnica que auxilia na sistematização de experimentos, abordando de forma multivariada os parâmetros característicos de cada procedimento, que então podem ser avaliados a partir da metodologia de superfície de resposta (RSM, na sigla em inglês)²⁷.

1.2 – A cadeia de alimentos no Brasil e seus resíduos

Estima-se que na produção agrícola 14 bilhões de toneladas de biomassa seca terrestre crescem por ano no mundo, sendo que cerca de 80% ainda é descartada como resíduo²⁸. Outra estimativa aponta que na cadeia de produção de alimentos, não contabilizando a biomassa residual do campo, cerca de 1,3 bilhões de toneladas de resíduos são gerados globalmente por ano²⁹, desperdício considerado um dilema social, ético, econômico e ambiental. Estes geram anualmente um prejuízo para as empresas de cerca de U\$ 750 bilhões, além de danos para o ambiente de aproximadamente 4,4 bilhões de toneladas de CO₂ equivalente³⁰. No Brasil, não há disponibilidade de dados seguros sobre a geração de resíduos alimentícios atualmente, mas pode-se inferir pela importância da agroindústria na economia, principal atividade brasileira com participação de cerca de 26,6% do PIB nacional, sendo a agricultura responsável por maior parte desta fatia³¹. Já a indústria de processamento de alimentos e bebidas alcançou em 2020 a marca de 10,6% do PIB, mostrando também ser uma das forças industriais brasileiras³². Considerando o fluxo de materiais em grande escala, estes dois setores juntos constituem a cadeia de alimentos do Brasil, com grande importância na geração de renda no país, porém também com grande impacto social e ambiental.

A geração de resíduos alimentares tanto por perda (na produção) ou por descarte (no comércio ou consumidor final) é de até 40% dos alimentos, praticamente idêntica em diferentes países, diferindo apenas na etapa da cadeia em que a maior parte deste resíduo é gerada³³. Mesmo quando aplicada uma política de redução do desperdício na área, com novas tecnologias e mudanças nos paradigmas sociais, ainda restam toneladas de resíduos que são muito dificilmente reduzidos, chamados resíduos inevitáveis. É o caso das indústrias de processamento de frutas e verduras, que geralmente têm como co-produtos as cascas, sementes, caroços e outras partes das plantas. Estas frações contêm diversas substâncias que podem ser extraídas e que, assim, agregam valor ao que antes era considerado resíduo^{34–38}.

Apesar de consistir apenas de matéria orgânica, a disposição destes tipos de resíduos tem sua complexidade pela alta concentração de carboidratos fermentáveis e açúcares, o que gera custos elevados para a indústria processadora de alimentos³⁹. É comum o emprego destas frações em usos rudimentares e de pouco controle técnico, como alimentação animal, geração de energia e compostagem, que

se feitos de forma correta podem ser métodos válidos de aproveitamento deste resíduo, contudo, sem utilizar o total potencial químico presente no mesmo⁴⁰. Com o desenvolvimento de novas tecnologias de separação, preferencialmente menos agressivas, é possível e desejável que uma única matriz vegetal possa gerar uma gama de produtos. Assim, ao incorporar um resíduo ao conceito de biorrefinaria, utilizando os princípios da Química Verde e Sustentável, podemos alcançar a circularidade desejada e contribuir para a diminuição dos efeitos antrópicos na natureza em diferentes formas de poluição, especialmente importante para um país agrícola como o Brasil¹⁷.

No cenário brasileiro de produção de alimentos, além dos grãos produzidos em larga escala, se destacam as frutas de plantas tropicais com grande produção, como as frutas do gênero *Citrus*, banana, abacaxi, manga e goiaba⁴¹. Além de outros compostos particulares de cada espécie, as frutas tropicais são reconhecidas pela alta presença de compostos bioativos⁴², i.e. substâncias que apresentam atividade sobre organismos vivos, sendo os metabólitos secundários os principais responsáveis por tais atividades. Produzidos em menores concentrações em relação a outros metabólitos, estes compostos são chamados de secundários por não atuarem diretamente no desenvolvimento das plantas, tendo funções principalmente relacionadas aos mecanismos de defesa das mesmas⁴³. Por conta disso, é comumente identificado que possuam atividade contra insetos, fungos, bactérias, algas, nematóides e outros organismos potencialmente nocivos para a planta⁴⁴. Os principais grupos de metabólitos secundários encontrados nas frutas tropicais são os flavonoides, xantonas, cumarinas, ácidos e aldeídos fenólicos, entre outros⁴². Estes podem ser utilizados isoladamente ou em extratos, aproveitando do sinergismo entre os diferentes compostos extraíveis das plantas, e conseqüentemente dos resíduos obtidos a partir delas. Ademais, de acordo com o que Banerjee et al. (2017)⁴⁵ recentemente reportaram, é comumente observado que a quantidade de metabólitos secundários encontrados é maior nos resíduos do processamento das frutas em comparação com a polpa das mesmas, o que reforça a importância do uso destes resíduos.

O uso destes compostos bioativos naturais se encaixa bem no atual cenário de pesticidas e biocidas, onde o emprego de substâncias sintéticas vem sendo criticado (e banido) por seus efeitos de toxicidade e persistência dos compostos ativos

e seus produtos de degradação no ambiente e nos alimentos produzidos⁴⁶. Para alcançar uma agricultura mais sustentável e verde, formulações que possam ser estáveis para aplicação como pesticidas, porém biodegradáveis após o uso, são desejadas⁴. É o caso de grande parte dos biopesticidas, substâncias ou formulações derivadas de produtos naturais ou micro-organismos⁴⁷. Os biopesticidas bioquímicos são os derivados de produtos naturais, incluindo extratos de plantas, cujas principais vantagens são relacionadas à sua matéria-prima renovável, seus diversos modos de ação, baixa toxicidade e biodegradabilidade⁴. Esta última indica também uma desvantagem, caso não balanceada com a estabilidade necessária para o seu uso antes da degradação. Outras desvantagens se dão pela variabilidade das plantas, sendo os extratos de complexo controle de qualidade, além da disponibilidade da matéria-prima⁴⁸. O uso de matéria-prima residual do processamento de frutas se dá, portanto, como uma forma de obter consistência e volume na disponibilidade do material utilizado na produção de biopesticidas.

Neste contexto, é importante considerar também práticas agrícolas mais sustentáveis, apesar do amplo entendimento do termo nesta área, sendo a agricultura orgânica um dos exemplos mais relevantes⁴⁹. A produção de alimentos orgânicos no Brasil ainda é uma área em expansão, com cerca de 1,2 milhões hectares plantados em 2017 e expectativa de crescimento contínuo anual de 2%, além de projeção de aumento do faturamento do setor de processamento em 25% ao ano⁵⁰. Por não utilizarem agroquímicos e fertilizantes sintéticos, este tipo de cultura pode ser considerada sustentável, pois não gera os resíduos tóxicos ocasionados pela utilização destes compostos, além de outros impactos ambientais e sociais relativos à produção agrícola convencional. Existem também evidências de que as plantas produzidas em regimes sustentáveis podem ter uma maior presença de metabólitos secundários, como os flavonoides e os compostos fenólicos em geral, como indicado por alguns estudos^{51,52}.

Por meio dos conceitos aqui discutidos, é possível visualizar a incorporação de elementos sustentáveis em todas as etapas da cadeia de alimentos, que além de contribuir para a redução dos impactos dos processos produtivos, também pode integrar resíduos, reduzir o volume de descarte dos mesmos e obter produtos de alto valor agregado que podem ser reaplicados na própria cadeia de alimentos, como biopesticidas, conservantes ou aditivos alimentares². Para isso, é

necessário o uso e desenvolvimento de processos químicos que permitam a separação dos compostos bioativos da matriz vegetal residuária, sendo o conjunto de técnicas de extração sólido-líquido o principal meio para efetuar estas separações.

1.3 – Extrações sólido-líquido: separações verdes e sustentáveis e como otimizá-las

Antes mesmo do invento das técnicas de destilação para obtenção de solventes orgânicos, sistemas de extração de matéria orgânica em água quente já existiam na civilização mesopotâmica, de acordo com relíquias datadas de 3.500 anos AC⁵³. O simples e rotineiro ato de fazer café ou chá já constitui uma das técnicas mais antigas deste tipo de extração. Para ser mais verde e sustentável, bem como apresentar uma abordagem biocircular, os remanescentes das matérias vegetais desta filtração eram utilizados para adubação, por exemplo. Após o descobrimento de novos tipos de solventes e técnicas de purificação dos mesmos, novos métodos foram desenvolvidos e aprimorados, sendo a percolação em solventes quentes uma das mais utilizadas, que depois veio a evoluir em métodos modernos populares como o de Soxhlet⁵³. As extrações sólido-líquido são técnicas de separação baseadas em partição, i.e. transferência de massa do soluto entre duas fases até equilíbrio, que ocorre ao misturar uma matriz sólida com um solvente líquido⁵⁴. Estas se tornaram processos importantes industrialmente, que juntamente com outras técnicas de separação são responsáveis por entre 30 a 70% dos custos de investimento em processos industriais⁵⁵. Além disso, as técnicas de extração sólido-líquido são imprescindíveis em métodos analíticos na etapa de preparo de amostra, sendo esta geralmente a etapa mais longa, responsável por 30% dos erros analíticos em análises de matrizes complexas⁵⁶.

Em matrizes vegetais, o mecanismo destas extrações pode ser resumido em três etapas (Figura 1.2): (1) penetração do solvente nos tecidos da planta e no interior das células vegetais; (2) solubilização e difusão do soluto para a camada superficial de solvente; (3) difusão do soluto da camada saturada na superfície do sólido para o corpo do solvente⁵⁷.

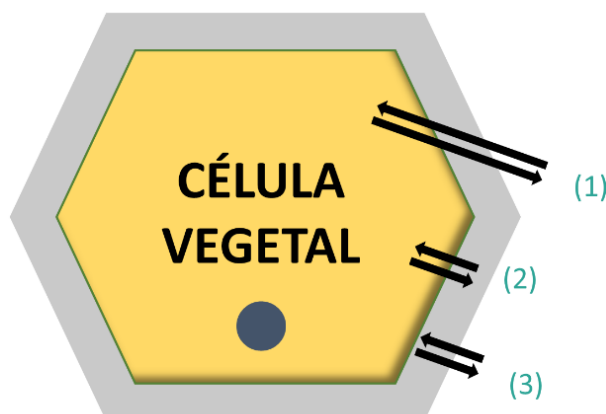


FIGURA 1.2 – Representação da célula vegetal e as três etapas que ocorrem nas extrações sólido-líquido. O círculo azul representa o soluto. Fonte: adaptado de Zuin, Segatto, Ramin (2018)¹.

A primeira etapa é caracterizada por um inchaço da matriz sólida ao iniciar o contato do solvente com a amostra seca. O uso de amostras secas é prática comum na extração de matrizes vegetais, pois assegura uma maior vida útil das amostras e garante a proporção desejada para o solvente utilizado⁵⁸. Durante esta primeira etapa, há inicialmente um gradiente maior de concentração, promovendo difusão do soluto entre o interior do sólido e o corpo do solvente, que então entra em equilíbrio, formando uma camada fina ao redor do sólido, menos móvel⁵⁸. Esta camada de solvente, saturada de soluto e outras substâncias, inibe uma maior difusão de dentro do sólido para fora, reduzindo a velocidade de extração. Esta etapa é limitada principalmente pelas características físico-químicas do solvente (especialmente sua viscosidade)⁵⁹.

A segunda etapa é ditada pela difusão do soluto do interior do sólido para a camada superficial de solvente, enquanto a terceira envolve a difusão do soluto desta camada para o corpo do solvente⁵⁸. É possível observar que, por mais que os métodos de extração sejam guiados pela busca do equilíbrio de concentração do soluto entre as fases, a cinética de transferência de massa também deve ser considerada para a otimização da extração⁶⁰. Desta forma, fatores como turbulência, tensão interfacial e a quebra das paredes das células vegetais são também importantes para o processo, além das características dos solventes e, principalmente, sua afinidade em relação ao soluto⁵⁴. Evidencia-se, portanto, a necessidade do estudo de novos meios líquidos, incluindo formas de encontrar misturas de solventes que otimizem as extrações, bem como técnicas de extração que

atuem nos fatores limitantes do processo de extração sólido-líquido. Algumas destas estratégias serão abordadas nas próximas sessões.

1.3.1 – Solventes para extrações sólido-líquido

Por conta do baixo rendimento mássico, extrações de produtos naturais envolvem o emprego de grandes proporções de solventes em comparação com outros processos⁶¹. Além do elevado volume, o uso de solventes gera impactos ambientais e na saúde dos operadores envolvidos. É imprescindível, portanto, que a escolha do solvente a ser utilizado leve em consideração não apenas os fatores relacionados à uma alta eficiência de extração, mas também sua toxicidade, inflamabilidade, persistência, recuperabilidade e preço, além dos impactos associados à sua síntese, se derivado de matérias-primas renováveis ou fósseis, e a complexidade de sua produção. Para isso, guias que determinam o grau verde dos solventes, levando em consideração todos estes fatores, são importantes para auxiliar na tomada de decisões. Entre eles, se destacam o guia de sustentabilidade de solventes da GSK⁶² e o guia de seleção de solventes *Chem21*⁶³, ambos utilizados neste trabalho.

Solventes clássicos aplicados na extração de produtos naturais envolvem principalmente os clorados (di e triclorometano), hexano, acetato de etila e metanol. Atualmente, é comum o uso dos álcoois metanólico e etanólico, em misturas com água, para extração de compostos bioativos fenólicos de média e alta polaridade⁶⁴. O uso de etanol pode ser considerado preferível ao de metanol, conforme classificado pelos guias de sustentabilidade para solventes^{62,63}, mas também por ser um solvente barato, produzido em grandes volumes a partir de matérias-primas renováveis, especialmente no Brasil (a partir da cana-de-açúcar)⁶⁵. Apesar de serem boas plataformas para extração de bioativos, as misturas etanólicas podem apresentar solubilidade limitada em compostos fenólicos e outras substâncias de interesse em matrizes vegetais. Por isso, solventes alternativos são amplamente estudados para uma melhor eficiência de extração destes compostos, sendo as principais classes de solventes os derivados de matérias-primas renováveis, ou biosolventes (lactato de etila, 2-metiltetrahydrofurano, *cyrene*, etc.), os fluidos supercríticos, a água subcrítica, os solventes eutéticos e os líquidos iônicos⁶⁶.

O contexto em que os líquidos iônicos (LIs) foram desenvolvidos envolve a procura por solventes que não promovessem a poluição característica da maioria dos solventes tradicionais, especialmente os Compostos Orgânicos Voláteis (COV). De fato, os LIs contêm características não-voláteis que conferem um grau verde aos processos que os envolvem. Isto se dá porque eles são constituídos por pares de sais orgânicos ou inorgânicos que são sólidos à temperatura ambiente, mas ao serem misturados em determinadas proporções, apresentam ponto de fusão abaixo de 100°C devido às ligações iônicas formadas entre os pares⁶⁷. Assim, formam-se produtos geralmente líquidos em temperatura ambiente e que apresentam excelente solubilidade para uma gama de compostos orgânicos e inorgânicos, também podendo ser personalizados para cada tipo de aplicação ao variar os compostos que os formam. Por outro lado, suas desvantagens incluem, em alguns casos, síntese complexa, alta toxicidade, persistência e baixa biodegradabilidade, tornando a primeira geração de LIs de alto impacto nas esferas ambientais e humanas⁶⁸. Além disso, a baixa volatilidade dos LIs dificulta sua recuperação e reciclagem após extração, tornando o processo de separação mais custoso e diminuindo seu grau verde.

Recentes desenvolvimentos em líquidos iônicos visam a síntese de compostos com melhor biodegradabilidade, diminuindo sua toxicidade ao utilizar matérias primas atóxicas ou até de origem natural e renovável. Além disso, busca-se também rotas de síntese mais rápidas e eficientes para, além dos outros fatores ambientais, cumprir as diretrizes da QS e chegar a processos mais sustentáveis que se utilizem de líquidos iônicos⁶⁸⁻⁷¹. O uso destes solventes é bem difundido, inclusive para extrações em matrizes vegetais, aliadas a extrações clássicas e também a técnicas consideradas mais verdes⁷².

1.3.2 – *Parâmetros de solubilidade Hansen (HSP)*

Uma das maneiras *in silico* de procurar alternativas de solventes para um produto ou processo se dá no emprego dos parâmetros de solubilidade de Hansen (HSP, na sigla em inglês). Estes foram criados a partir da expansão do parâmetro de solubilidade Hildebrand em três fatores que correspondem às principais interações moleculares: de dispersão (δ_D), de dipolaridade (δ_P) e de ligação de hidrogênio (δ_H)⁷³. Baseado no fato de que “semelhante atrai semelhante”, os parâmetros de Hansen são

utilizados para prever a solubilidade de um soluto em relação a diferentes solventes. Ao plotar os valores dos três HSPs em um gráfico tridimensional (espaço de Hansen), é possível mapear uma chamada “esfera de Hansen” de um soluto, i.e. o volume esférico centrado no ponto (δ_D , δ_P , δ_H) cujos limites determinam a solubilidade do mesmo⁷³. Desta forma, os solventes cujos valores de δ_D , δ_P e δ_H os posicionam dentro desta esfera no espaço de Hansen são capazes de solubilizar a substância em questão, e a distância deste ponto em relação ao centro da esfera indica o grau de solvabilidade deste solvente. Assim, os parâmetros de Hansen podem ser determinados a partir de cálculos teóricos baseados na estrutura molecular das substâncias estudadas ou a partir de uma aproximação empírica determinada pela solubilidade destas substâncias em diversos solventes, cujos HSPs já foram anteriormente calculados.

Amplamente utilizados para a predição de solventes para polímeros, especialmente para a procura de solventes menos agressivos, os HSPs foram pouco utilizados para encontrar melhores solventes puros ou misturas que otimizem as extrações de produtos naturais. Recentemente, Sánchez-Camargo et al.⁷⁴ (2019) revisaram a literatura e encontraram um maior interesse acadêmico na última década, destacando o uso desta ferramenta em extrações com plantas para procura de solventes mais verdes, que na maioria das vezes foi corroborada por dados empíricos de eficiência de extração. Curiosamente, ao analisar compostos-alvo não voláteis, diversas publicações obtiveram como melhor solvente o etanol e suas misturas, como pode ser visto para a extração de flavonoides a partir de resíduos de uva⁷⁵ e ácidos fenólicos a partir de resíduo aquoso da destilação à vapor de folhas de manjeriço⁷⁶.

1.3.3 – *Extração Assistida por Homogeneizador (EAH)*

Na Extração Assistida por Homogeneizador (EAH), também conhecida por turbólise, os componentes solúveis de uma dada amostra sólida são extraídos por contato com um solvente adequado, submetidos à homogeneização em um equipamento com um rotor de alta velocidade, que pode chegar a 30.000 rpm. Assim, a extração ocorre concomitantemente à redução do tamanho da partícula – resultado da aplicação de elevadas forças de cisalhamento, neste caso, as rotações em alta velocidade do equipamento dispersor⁷⁷. Desta forma, ocorre o rompimento celular da partícula ao mesmo tempo que a homogeneização da mistura sólido-líquido,

favorecendo a transferência de massa do soluto, o que torna rápido o tempo de extração, na ordem de segundos até alguns minutos. Por conta disso, além de seu baixo custo energético e de manutenção, esta técnica pode ser considerada verde, incorporando alguns aspectos que podem tornar a metodologia de processamento sustentável.

Por ser uma técnica rápida, a EAH vem sendo utilizada extensivamente para preparo de amostra em metodologias analíticas, e alguns exemplos podem ser encontrados na literatura para extração de compostos bioativos a partir de matrizes naturais⁷⁸ – mesmo que dispersos pela não uniformidade da nomenclatura da técnica. No Brasil, a técnica foi otimizada de acordo com os fenólicos totais a partir de cascas de banana, utilizando misturas etanólicas para encontrar uma maior concentração de fenólicos⁷⁷. Outros exemplos incluem o uso de EAH: nas extrações de fenólicos em espécies de *Salvia coccínea* com metanol, etanol, água e suas misturas⁷⁹; com glicerol como solvente para otimização de fenólicos e flavonoides totais em resíduos de uva vermelha⁸⁰; para extração de flavonoides em resíduos de laranja⁸¹ e maracujá⁸², estudos publicados anteriormente em nosso grupo de pesquisa; entre outras publicações recentes^{83–85}. Com frequência, estudos comparativos demonstram uma maior eficiência de extração de compostos bioativos utilizando EAH, como concluído para a quantificação de fenólicos totais em folhas de *Moringa oleifera*⁸⁶.

1.3.4 – Extração Assistida por Micro-ondas (EAM)

A Extração Assistida por Micro-ondas (EAM) é um método de extração sólido-líquido que difere dos convencionais em diferentes aspectos. Ela ocorre pelo uso de ondas eletromagnéticas (geralmente em 2,45 GHz) que promovem o aquecimento dielétrico em moléculas com alta constante dielétrica, como a água. Esse processo envolve transferências de massa e calor na mesma direção, de dentro da matriz do sólido para fora, enquanto nas extrações convencionais os dois transportes estão em sentidos opostos¹. O aquecimento dielétrico das moléculas de água presentes dentro das células vegetais facilita a quebra de suas paredes celulares, aumentando a disponibilização dos solutos, entre outros efeitos de convecção causados pelas transferências de calor⁸⁷. Imagens de microscopia eletrônica de varredura feitas em cascas de laranja comprovam este evento de ruptura das células

vegetais, sugerindo um aumento na eficiência de extração de produtos naturais pelo efeito das micro-ondas⁸⁸.

Uma representação deste mecanismo pode ser observada na Figura 1.3, ocorrendo em três etapas: (1) as moléculas de água absorvem radiação eletromagnética (micro-ondas), aquecem e evaporam; (2) ocorre um aumento na temperatura e pressão dentro das células vegetais, que causam inchaço na estrutura celular e eventualmente rompimento das paredes celulares; (3) facilitado pelo rompimento, o solvente penetra nas células vegetais, favorecendo a disponibilização do soluto.

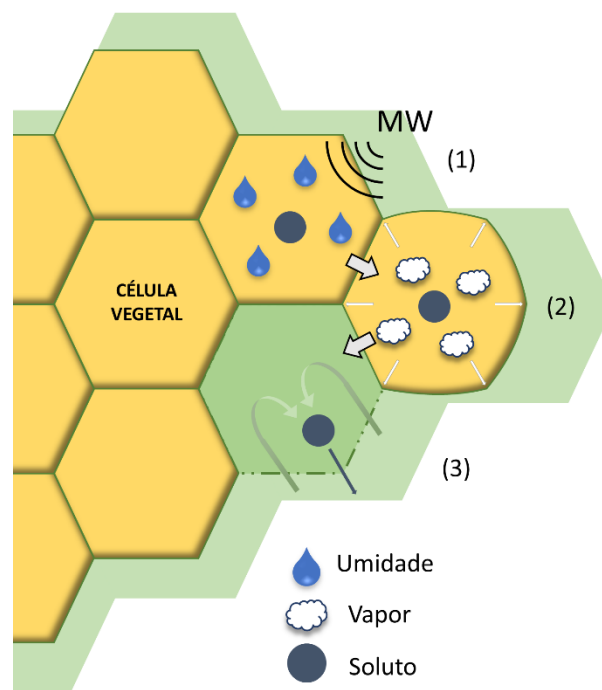


FIGURA 1.3 – Representação do mecanismo de extração em matrizes vegetais por EAM. Fonte: adaptado de Zuin, Segatto, Ramin (2018)¹.

Parâmetros como a razão sólido-solvente, tempo, quantidade de ciclos, potência, superfície de contato e umidade do sólido podem ser variados para otimizar a extração. Em geral, a EAM oferece extrações relativamente simples em curto tempo, um volume menor de solventes utilizados e maior segurança de operação. Além disso, por minimizar a degradação de compostos extraídos, é uma técnica muito utilizada na extração de produtos naturais bioativos, como os fenólicos⁴⁵. A técnica é comprovadamente eficiente para a extração destes tipos de compostos em

comparação a métodos convencionais, inclusive industrialmente, como discutido por Chemat e colaboradores em 2012⁸⁹. Esta técnica também foi utilizada em trabalhos anteriores em nosso grupo de pesquisa, demonstrando resultados consistentes com a literatura e promissores quanto à sua utilização em maiores escalas^{81,82}.

1.3.5 – Extração por Dispersão de Matriz em Fase Sólida (DMFS)

A técnica de Dispersão da Matriz em Fase Sólida (DMFS) é considerada uma variação da extração em fase sólida (SPE, na sigla em inglês), combinando as etapas de homogeneização, extração e fracionamento de amostras sólidas, semi-sólidas ou viscosas em apenas um procedimento. Ela funciona de acordo com as interações de uma amostra com um suporte de fase sólida, ambos misturados e completamente macerados, etapa que diferencia esta técnica das SPE tradicionais e favorece o rompimento das paredes das células vegetais, no caso de extração de produtos naturais⁹⁰. Em seguida, a mistura é adicionada a uma coluna por onde passa a fase móvel, que extrai e separa os substratos em diferentes frações, se necessário. A etapa de eluição é comumente realizada com o auxílio de vácuo, como pode ser visto na Figura 1.4.

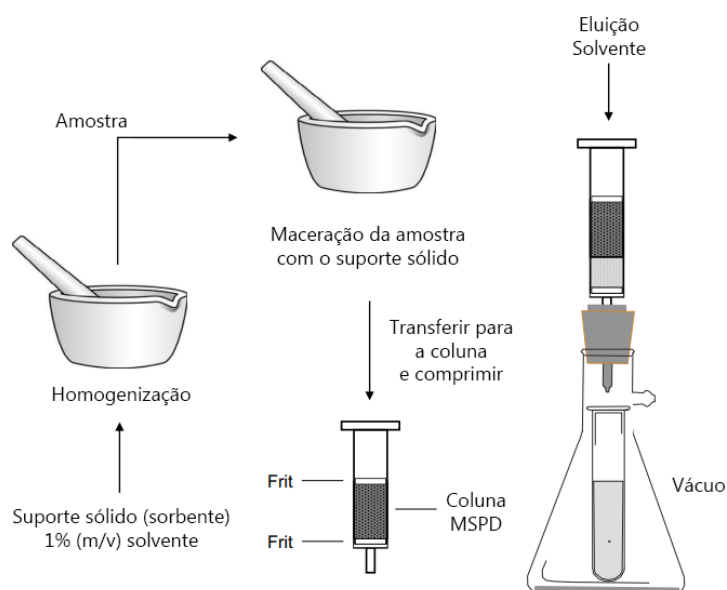


FIGURA 1.4 – Procedimento de extração por DMFS. Fonte: adaptado de Segatto, Zanotti, Zuin (2021)⁹¹.

A eficiência de extração é definida, então, pela disponibilidade do soluto (melhorada pela maceração) e as interações entre soluto, solvente e suporte sólido (sorbente), que pode seletivamente reter alguns compostos enquanto não retém outros, mesmo princípio que ocorre em colunas cromatográficas. A seleção do sorbente também é de grande importância, de acordo com a características dos compostos-alvo e a necessidade de seletividade ou não. Também é possível incluir uma etapa de lavagem anterior à extração, focada em eluir compostos não desejados no extrato.

Este método vem sendo utilizado para extrações de compostos com bioatividade a partir de produtos naturais, em amostras com diversos níveis de complexidade^{90,92}. Apesar disto, ainda é um método pouco explorado e de grande potencial em termos de eficiência, sendo também adaptado absorvendo outras técnicas analíticas, especialmente na etapa de maceração⁹³⁻⁹⁵. Por ser de alta eficiência e encurtar as etapas da metodologia analítica, esta técnica foi selecionada como um método verde para avaliação da extração de bioativos neste trabalho.

1.3.6 – *Extração Assistida por Ultrassom (EAU)*

Ultrassons são ondas vibracionais (20 kHz - 1 GHz) que propagam em sólidos e fluidos, criando movimentos vibracionais que se espalham pela trama molecular dos materiais. Quando periódicos, estes movimentos vibracionais geram zonas de alta e baixa pressão que, em altas potências, provocam a geração de bolhas de cavitação, vazios criados pela superação das forças de atração entre as moléculas de substâncias líquidas. Estas bolhas, quando excedem seu limite máximo de tamanho, se colapsam gerando zonas de alta pressão e temperatura¹. Este fenômeno é o principal responsável pela ocorrência de reações químicas e outros efeitos em compostos sob efeito de ultrassons, incluindo a promoção de maiores eficiências de extrações sólido-líquido. Isto ocorre devido ao colapso das bolhas de cavidade nas superfícies dos sólidos, favorecendo a quebra das paredes celulares em amostras de plantas⁹⁶ (Figura 1.5). Além dos efeitos já discutidos causados pela escolha do solvente nas extrações, este também afeta a formação das bolhas de cavitação e tem ainda maior efeito no rendimento de separação⁹⁷.

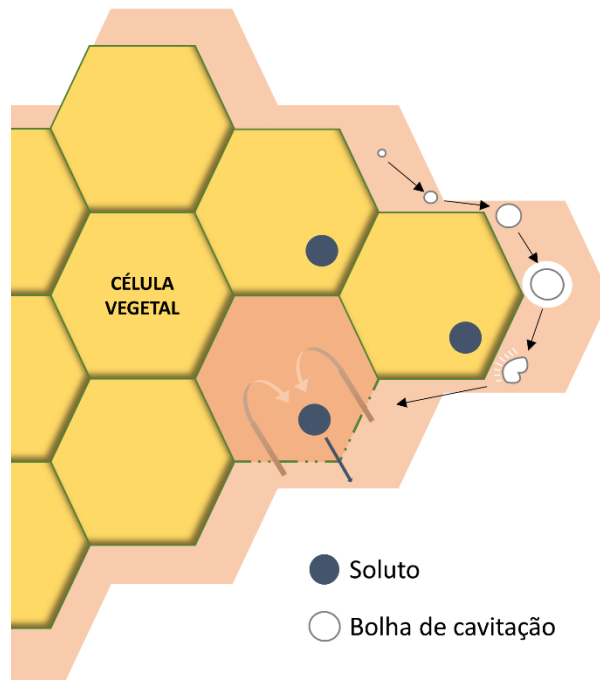


FIGURA 1.5 – Representação do mecanismo de extração da EAU em matrizes vegetais. Fonte: adaptado de Zuin, Segatto, Ramin (2018)¹.

Muito utilizado para limpeza de superfícies e solubilização de materiais, são comuns os usos de banhos de ultrassom em água, que auxiliam na propagação das ondas vibracionais, além de sondas ultrassônicas que podem ser inseridas diretamente no meio reacional ou de extração¹. Apesar de apresentarem um maior consumo médio de solvente e maior tempos de extração, a EAU demonstra ser uma técnica simples, segura e reproduzível. Além disso, sua escalabilidade em níveis industriais também demonstra algumas limitações pelo maior consumo energético e diminuição de eficiência⁹⁸, ainda que diversos exemplos são encontrados com uso de novos equipamentos que tentam superar estas barreiras técnicas⁹⁹. Assim como a extração por micro-ondas, esta técnica se difundiu amplamente entre as metodologias no campo de análises de alimentos e produtos naturais¹⁰⁰.

1.4 – Resíduos de frutas tropicais brasileiras e seus potenciais

Nesta seção serão apresentadas as principais matrizes vegetais residuárias estudadas no escopo deste trabalho, selecionadas de acordo com diversos fatores descritos abaixo.

1.4.1 – Manga (*Mangifera indica*)

A manga (*Mangifera indica* L.) é um dos frutos de interesse para o aproveitamento de seus subprodutos em um contexto de circularidade dos processos agroindustriais envolvidos. A espécie da manga é nativa do sudeste asiático e maior parte da sua produção é proveniente da Índia e da China. Ainda assim, a planta foi trazida para a América Latina e obteve uma boa adaptação ao clima tropical da região, que hoje é responsável por mais de 10% da produção mundial¹⁰¹ (estatísticas da FAO agregam espécies de manga, goiaba e mangostim). Em 2020, a produção de manga no Brasil atingiu pouco mais de 1,6 milhão de toneladas, valor 50% maior em relação a 15 anos atrás^{102,103}. O estado de São Paulo contribui com uma quantia significativa deste cultivo, com cerca de 14% da produção nacional¹⁰³. A manga é consumida tanto *in natura* quanto processada, presente em sucos, doces e outros produtos industrializados. Quando processada, a polpa da fruta é separada da casca e do caroço (constituído da casca e amêndoa), que somam de 14 a 22,5% do peso da fruta, dependendo da variedade da manga¹⁰⁴. Além disso, o subproduto do processamento da manga também inclui partes não aproveitadas da polpa, sendo geralmente as frações fibrosas da mesma. A composição geral deste resíduo é de 11,9 g de carboidratos, 8 g de proteínas e 5,9 g de lipídeos a cada 100 g do material seco¹⁰⁵, valor que também pode variar de acordo com as condições utilizadas.

Em artigo publicado com parte dos dados produzidos neste trabalho de doutorado, realizamos um estudo de caso de biorrefinaria de manga, analisando as principais frações da fruta e seus potenciais produtos (Figura 1.6)¹⁰⁶. Demonstramos, através de estudos diversos encontrados na literatura, a capacidade desta plataforma ser utilizada como modelo para a exploração da total complexidade química existente nas frutas e seus resíduos de processamento. É possível, portanto, extrair compostos funcionais, como a celulose, o amido e a pectina, além de compostos e extratos bioativos, aproveitando todas as frações da manga. Trabalhos recentes estão buscando, também em termos econômicos, os parâmetros necessários para a implementação de biorrefinarias que façam o melhor aproveitamento possível dos resíduos da manga^{107,108}.

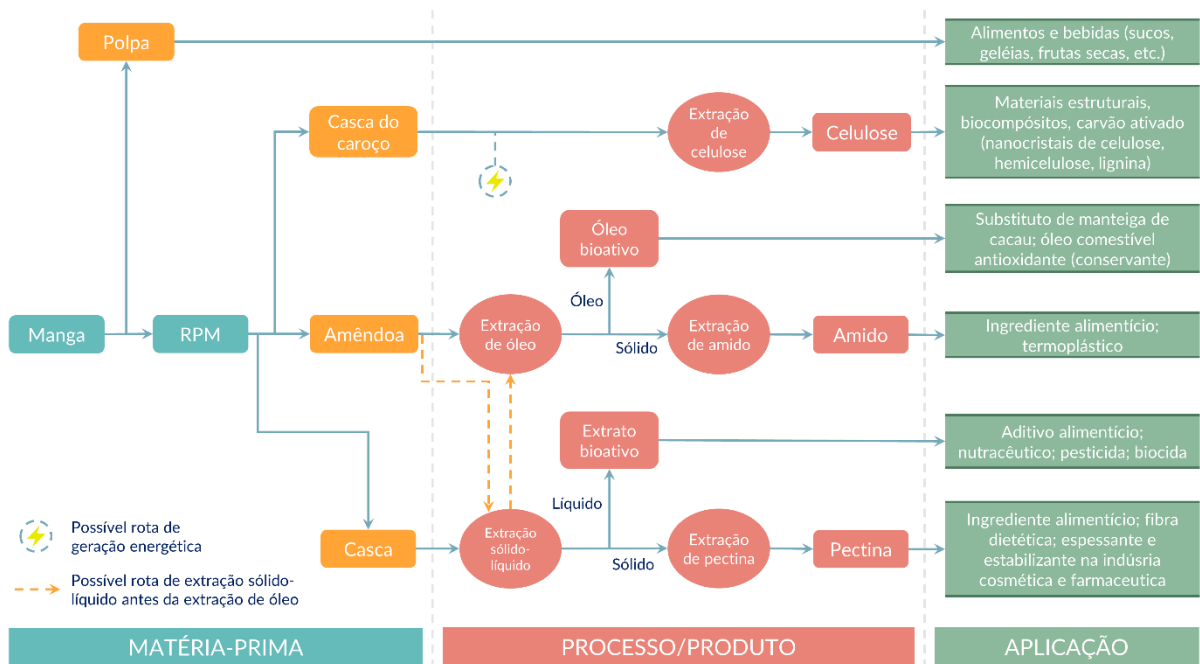


FIGURA 1.6 – Estudo de caso de biorrefinaria para frutas de manga. Fonte: adaptado de Zuin, Segatto, Zanotti (2020)¹⁰⁶.

O potencial de bioatividade da manga e seus co-produtos vêm sendo explorado, especialmente para a sua atividade antioxidante resultante da presença de compostos fenólicos. Os principais compostos responsáveis por esta alta atividade biológica são a mangiferina, o hiperosídeo (quercetina-3-O-galactosídeo), a cumarina, a quercetina e o ácido gálico (Figura 1.7), entre outros compostos, como reportado por diversos autores^{109–113}. O uso dos resíduos da manga para aplicações com interesse em sua bioatividade^{110,113–117} revela a importância em explorar formas eficientes de extração de seus compostos com maior atividade, de forma a alcançar aplicações mais eficazes.

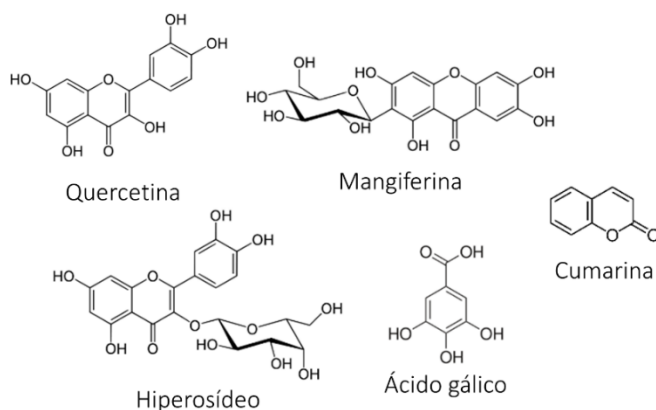


FIGURA 1.7 – Principais bioativos encontrados nos resíduos de manga.

A xantona mangiferina e o flavonoide hiperosídeo são dois dos principais compostos encontrados nos co-produtos de manga, sendo os mais estudados em termos de atividades biológicas, mais expressivamente em estudos explorando suas propriedades terapêuticas e de preservação de alimentos¹¹⁸. A mangiferina demonstrou ter potencial por sua atividade anticâncer¹¹⁹ e anti-inflamatória¹²⁰, com baixa toxicidade ao corpo humano. Atuações farmacológicas semelhantes são encontradas também para o hiperosídeo, especialmente em atividades antidiabéticas, cardioprotetoras e neuroprotetoras¹²¹. Em relação à atividade inseticida, o extrato (acetato de etila) da amêndoa da manga, bem como mangiferina isolada deste extrato, foram testados contra larvas do mosquito doméstico *Culex pipiens L.* e demonstraram atividade promissora¹²². O extrato etanólico da amêndoa da manga demonstrou atividade contra o fungo *Colletotrichum brevisporum*, organismo patogênico à própria fruta de manga¹²³. Extratos brutos de outras espécies de plantas contendo hiperosídeo também demonstraram atividade herbicida^{124,125} e inseticida¹²⁶. Não foram encontrados estudos explorando a atividade algicida de extratos de manga e seus compostos. Porém, flavonoides como quercetina e rutina encontrados em extratos de planta demonstraram ser ativos contra diferentes espécies de algas e cianobactérias¹²⁷⁻¹²⁹, o que pode indicar uma possível atuação dos extratos de manga.

Em termos de extrações em resíduos do processamento da manga, destacam-se as pesquisas que procuram otimizar as extrações de polissacarídeos, presentes em notável quantidade neste tipo de amostra. Destacam-se a pectina, obtida por técnica assistida por micro-ondas^{130,131} e solventes verdes^{132,133} a partir da casca e de amido¹³⁴ e nanocristais de celulose¹³⁵ obtidos do caroço da fruta. Já o isolamento de compostos fenólicos é feito convencionalmente por método de maceração (ou homogeneização)¹³⁶. Otimizações de métodos alternativos considerados sustentáveis foram realizadas por técnica assistida por ultrassom¹³⁷ e utilizando CO₂ supercrítico¹³⁸ a partir das cascas, enquanto a extração assistida por micro-ondas¹³⁹ foi otimizada para a fração do caroço. Apesar das importantes contribuições, a otimização dos métodos por estes autores foi realizada a partir dos resultados de compostos fenólicos totais e atividade antioxidantes dos extratos, não em termos dos compostos ativos. Mercado-Mercado e colaboradores avaliaram a extração de carotenoides, outro tipo de metabolitos secundários, utilizando técnica assistida por ultrassom¹⁴⁰. Desta forma, a quantificação dos compostos ativos e a

otimização de sua extração por métodos alternativos é um cenário promissor para a viabilização da utilização de tais compostos em aplicações reais e sustentáveis.

1.4.2 – Goiaba (*Psidium guajava*)

A goiaba (*Psidium guajava*) é outra fruta de interesse para utilização de sua biomassa por meio da aplicação dos conceitos de biorrefinaria e Química Verde. Nativa da América Latina, ela se adapta facilmente em áreas de clima tropical ou subtropical, sendo também popular na Índia. Além do próprio valor nutricional da fruta, partes da planta têm sido utilizadas pelos povos nativos latino-americanos como planta medicinal, especialmente suas folhas, para tratamento de complicações gastrointestinais^{141,142}. O consumo da fruta pode ser de forma natural ou processada, em produtos como sucos, geleias, doces, sorvetes e iogurtes. A produção brasileira de goiaba atingiu cerca de 466 mil toneladas no ano de 2020, com crescimento de 35% desde 2005, o que demonstra uma tendência otimista com relação ao seu cultivo e processamento, ainda mais quando comparado a outras frutas tropicais que tiveram queda ou se mantiveram constantes neste período^{102,103}. A produção concentra-se nas regiões sudeste e nordeste do país, em especial no estado de São Paulo, que é responsável por um terço da produção nacional (cerca de 150 mil toneladas), da qual 62%, em média, é destinada para o setor industrial para ser processada¹⁴³. Na indústria, a fruta é despolpada e gera resíduos constituídos basicamente de casca e semente. Calcula-se que aproximadamente 10 mil toneladas deste co-produto foram produzidas em 2004 somente no estado¹⁴⁴, número que extrapolado para os dias atuais pode chegar a mais de 12 mil toneladas por ano.

A composição básica do resíduo da goiaba é de 22,2 g de carboidratos, 4,8 g de proteína e 1,4 g de lipídeos a cada 100 g do material seco¹⁰⁵. Entretanto, estes valores podem divergir consideravelmente de acordo com a variedade da fruta, o local de cultivo e a proporção de casca e sementes^{145–150}. Mais especificamente, há uma maior presença de substâncias como pectina, glicosinolatos e compostos antioxidantes, sendo que os dois últimos podem ser apontados como responsáveis pelos efeitos bioativos dos frutos da goiaba^{113,151–157}. Grande parte desta atividade antioxidante se dá pelos metabólitos secundários presentes na fruta, especialmente os compostos fenólicos e polifenólicos, que segundo da Silva et al. (2014)¹⁵⁸ estão em quantidades superiores no co-produto do processamento da goiaba em comparação

com a sua polpa. Dentre estes compostos, o ácido gálico, a vanilina, a quercetina e a catequina (Figura 1.8) se destacam por aparecerem em maior concentração nos extratos de polpa e resíduos de processamento de goiaba, como relatado por diversos autores^{159–161}.

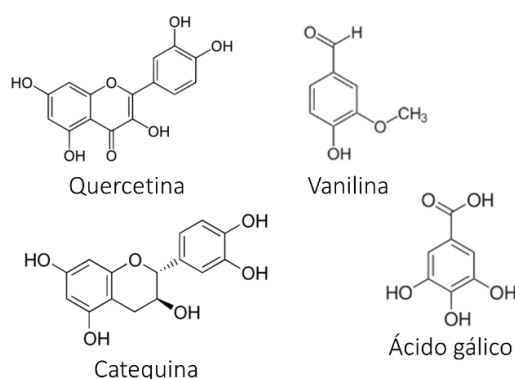


FIGURA 1.8 – Principais compostos fenólicos bioativos encontrados nos resíduos de goiaba.

Em revisão recentemente publicada sobre a bioatividade de flavonoides e suas potencialidades, revelamos que a quercetina e seus derivados (como o hiperosídeo encontrado na manga) são os principais flavonoides estudados por suas atividades biológicas – tanto isolados quanto presentes nos extratos testados⁴. Isto se dá porque a quercetina é um dos metabólitos secundários mais abundantes na natureza, sendo estudado para diversas aplicações relacionadas à saúde humana¹⁶². Também foram encontrados estudos relacionados à atividade inseticida da quercetina, demonstrando potencial do seu uso nesta aplicação, especialmente em sinergismo com outros compostos ativos^{163,164}. Já a vanilina, composto conhecido por seu uso como agente aromatizante, ainda é pouca estudada por sua atividade biológica, mesmo exibindo ações antioxidantes, bactericida e antifúngica¹⁶⁵. Em misturas com óleos essenciais de diferentes plantas, a vanilina demonstrou sinergismo ao repelir e matar mosquitos da espécie *Aedes aegypti*¹⁶⁶.

A maior parte dos trabalhos encontrados para os resíduos de goiaba se limita à determinação dos compostos presentes nas frações da biomassa, enquanto há poucos estudos concentrados em estudar diferentes técnicas para otimização da extração de fenólicos, convencionalmente feita por Soxhlet ou homogeneização¹⁶⁷. Técnicas mais sustentáveis de extração são exploradas por Sukeksi et al. (2016)¹⁶⁸,

que realizaram um estudo de extração de polifenólicos em resíduos de goiaba utilizando ultra-filtração com membranas. Um outro grupo de pesquisa explorou o uso de fluidos supercríticos para a extração de fenólicos a partir das sementes da fruta, como demonstrado em duas publicações^{169,170}. O cenário apresentado para os resíduos agroindustriais da goiaba demonstra a oportunidade de explorar e otimizar, utilizando métodos estatísticos eficientes, novas técnicas de extração ainda não testadas para o isolamento de seus compostos bioativos.

1.4.3 – Laranja (*Citrus sinensis*)

O Brasil é o maior produtor mundial das frutas do gênero *Citrus*, sendo essa a produção mais abundante no mundo entre as árvores frutíferas. Dentre as frutas deste gênero, a laranja é a produzida em maior quantidade, com cerca de 60% do total. Em 2020, o Brasil deteve 22% da produção mundial de laranjas (16,7 mi de toneladas), sendo 78% deste valor apenas no estado de São Paulo^{103,171}. A maior parte das laranjas produzidas no país é processada (estimado em 80%)¹⁷², gerando um resíduo que constitui, ao menos, 50% da massa da fruta¹⁷³. Desta forma, é possível estimar uma geração anual de cerca de 5,2 mi de toneladas de resíduos apenas no estado de São Paulo. Este resíduo é formado essencialmente de seu bagaço (flavedo, albedo e demais partes), sementes e partes da polpa não aproveitadas. Nestas frações, os principais componentes essenciais encontrados são os açúcares, celulose, hemicelulose, pectina, D-limoneno e compostos fenólicos, especialmente os flavonoides³⁷. O aproveitamento destes co-produtos é um exemplo prático da viabilidade de biorrefinarias baseadas na produção de frutas para o gênero alimentício, já compondo 12% da receita total do setor processador de *Citrus* no Brasil, gerados pela exportação de óleo essencial de laranja, D-limoneno, terpeno cítrico e farelo de polpa cítrica¹⁷⁴.

Ainda há potencial na exploração das diferentes frações dos co-produtos da laranja, em especial nos compostos fenólicos que exibem bioatividade. Os flavonoides são encontrados particularmente em grandes quantidades nos resíduos da laranja, sendo o principal deles a hesperidina (hesperetina-7-O-rutinosídeo), além da hesperetina, nobiletina e naringenina (Figura 1.9).

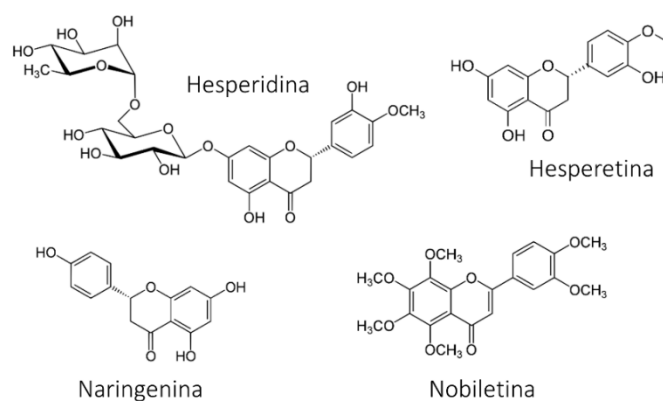


FIGURA 1.9 – Principais compostos bioativos presentes nos resíduos de laranja.

Como reportado na literatura, a hesperidina é encontrada em maiores concentrações na casca da laranja do que na polpa e sementes. Este flavonoide glicosilado demonstra diversas atividades benéficas para o corpo humano, dentre elas a atividade contra doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, além dos efeitos anti-inflamatório e antioxidante¹⁷⁵. Interesse recente foi atraído para a hesperidina por suas ações antivirais, demonstrando ser mais eficiente que drogas antivirais comerciais (como a cloroquina e hidroxicloroquina), com menor efeito tóxico, sendo também estudada como profilático para tratamento de COVID-19 e outras doenças causadas por vírus¹⁷⁶. Em estudo recente, a complexação de hesperidina com cobre e fenantrolina demonstrou maior efeito letal contra larvas do inseto *Spodoptera frugiperda* em comparação com outros flavonoides¹⁷⁷. Extratos aquosos de limão contendo hesperidina, obtidos com extração assistida por micro-ondas, mostraram ação antifúngica relevante em ensaios in vitro com *Alternaria alternata*¹⁷⁸. Atividade antialimentar contra diferentes insetos também foi encontrada em hesperidina isolada da planta *Fagara macrophylla*¹⁷⁹. Apesar destas publicações, poucos trabalhos foram encontrados na literatura explorando a atividade inseticida deste composto e dos extratos de resíduos de laranja, demonstrando potencial campo de pesquisa para exploração, como tem sido feito pelos grupos de pesquisa em Química Verde, Sustentabilidade e Educação e de produtos naturais, da UFSCar, cadastrados no CNPq^{61,81,177}.

2 – Objetivos

Este trabalho tem como objetivos:

- **Principal:** desenvolver e aplicar métodos analíticos verdes na extração de produtos bioativos de interesse a partir de resíduos de processamento de frutas da agroindústria brasileira;

- **Específicos:**
 - Utilizar ferramentas quimiométricas no planejamento dos experimentos e análise dos resultados para obter condições ótimas de extração;
 - Estudar e comparar diferentes técnicas de extração consideradas verdes;
 - Comparar amostras provenientes de práticas de agricultura convencional e orgânica;
 - Estudar solventes alternativos para buscar melhor eficiência de extração;
 - Avaliar as atividades biológicas dos extratos obtidos e sua viabilidade na utilização como agente biocida e pesticida.

3 – Metodologia

3.1 – Materiais e equipamentos

Os materiais e equipamentos utilizados em todos os experimentos desenvolvidos e descritos nesta tese estarão listados nesta seção. Para referência, estes serão mencionados nas seções posteriores apenas pela marca ou tipo de material.

a) Obtenção e condicionamento das amostras:

- Liofilizador E-C Modulyo (Thermo-Fisher, Waltham, MA, EUA)
- Estufa de convecção de ar TE-394/3 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil)
- Moinho analítico A11 Basic (IKA, Staufen im Breisgau, Alemanha)
- Processador doméstico IBE20 (Electrolux, Curitiba, PR, Brasil)

b) Extração assistida por homogeneizador com soluções aquosas de líquidos iônicos (EAH-LIs) e extração assistida por homogeneizador com soluções etanólicas ácidas (EAH-HCl):

- HPLC acoplado ao detector de arranjo de diodos (DAD) (Shimadzu, Quioto, Japão) com fase estacionária Nucleodur C8 column (3 μm ; 2x125 mm) (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha)
- Água ultrapura tipo 1 (Stakpure, Niederahr, Alemanha), ácido fórmico 98-100% (Merck, Darmstadt, Alemanha) e metanol grau LC-MS (Fisher Scientific, Loughborough, Reino Unido)
- Padrões analíticos e suas respectivas purezas: mangiferina $\geq 98,0\%$ (Sigma-Aldrich, San Luiz, MO, EUA); hiperosídeo $\geq 98,5\%$ (HWI group, Ruelzheim, Alemanha); vanilina $\geq 99,0\%$ (Sigma-Aldrich, San Luiz, MO, EUA); e quercetina $\geq 95,0\%$ (Sigma-Aldrich, San Luiz, MO, EUA)
- Ultra-Turrax T25 basic (IKA, Staufen im Breisgau, Alemanha)
- Centrífuga Rotanta 460 (Hettich, Tuttlinger, Alemanha)
- Balança Entris 224-1S (Sartorius, Goettingen, Alemanha)
- Filtro de seringa de 0,45 μm Chromafil® Xtra PES-45/25 (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha)
- Para os extratos: etanol absoluto $\geq 99,8\%$ (Fisher Scientific, Loughborough, Reino Unido) e água ultrapura do tipo 1 (Stakpure, Niederahr, Alemanha)
- Líquidos iônicos da Iolitec (Heilbronn, Alemanha), com 97% ou mais de pureza.

c) Para os demais métodos cromatográficos descritos:

- Sistema UHPLC Acquity H-Class UPLC, acoplado ao detector de arranjo de diodos (DAD) Acquity PDA (Waters Corporation, Milford, MA, EUA)

- Fases estacionárias: Acquity HSS C18 (1.8 µm; 2.1x100 mm), Acquity CSH C18 (1.7 µm, 2.1 x 100 mm) e Acquity BEH C8, (1,7 µm; 2,1 x 50 mm) (Waters Corporation, Milford, MA, EUA)
 - Solventes: água ultrapura grau 1 (sistema de ultrapurificação MiliQ, Milipore, Burlington, EUA), metanol e acetonitrila grau HPLC (Tedia, Fairfield, OH, EUA; e Honeywell, Charlotte, NC, EUA) e ácido fórmico grau LC-MS (Êxodo Científica, Sumaré, SP, Brasil)
 - Padrões analíticos e suas respectivas purezas: mangiferina ≥98,0% (Sigma-Aldrich, San Luiz, MO, EUA); hiperosídeo ≥98,5% (HWI group, Ruelzheim, Alemanha); vanilina ≥99,0% (Sigma-Aldrich, San Luiz, MO, EUA); quercetina ≥95,1% (Sigma-Aldrich, San Luiz, MO, EUA); e hesperidina ≥98% (Sigma-Aldrich, San Luiz, MO, EUA)
- d) Para as extrações assistidas por homogeneizador (EAH-EtOH e demais), por micro-ondas (EAM), por ultrassom (EAU) e a dispersão de matriz em fase sólida (DMFS):
- Ultra-Turrax T10 basic (IKA, Staufen im Breisgau, Alemanha)
 - Sorbentes Florisil® 60-100 mesh (Sigma-Aldrich, San Luiz, MO, EUA) e sílica *flash* esférica C18 45-75 µm (Supelco, Bellefonte, PA, EUA)
 - Ethos X (Milestone, Sorisole, Itália), com módulo de extração FastEX
 - Banho de ultrassom Elmasonic Easy 40 H (Elma, Singen, Alemanha)
 - Centrífugas Mikro 185 (Hettich, Tuttlinger, Alemanha) para extratos com volume de até 2,5 mL e centrífuga 5810R (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) para extratos de 2,5 a 50 mL
 - Filtro de seringa PTFE hidrofóbico com 0,45 µm de tamanho de poro (Analítica, São Paulo, SP, Brasil)
 - Balanças para massas entre 10 mg e 220 g, BEL M214Ai (BEL Equipamentos Analíticos, Piracicaba, SP, Brasil); para massas maiores que 220g, BEL S2202 (BEL Equipamentos Analíticos, Piracicaba, SP, Brasil)
 - Solventes: água ultrapura tipo 1, para soluções-estoque de padrões analíticos, e água destilada para extratos; etanol absoluto P.A. 99,5% (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- e) Para os ensaios de atividade algicida:
- Culturas de *Raphidocelis subcapitata* derivadas da coleção de cultura de algas da Universidade de Goettingen (Alemanha)
 - Placas de cultura de 24 poços (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria)
 - Filtro de seringa com membrana hidrofílica de 0,2 µm (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha)
 - Incubadora AlgaeTron AG 130-ECO (Photon Systems Instruments, Drasov, República Tcheca)
 - *Shaker* Unimax 1010 (Heidolph Instruments, Schwabach, Alemanha)
 - Detector por fluorescência para placas de cultura Synergy HT (Biotek Instruments, Winooski, VT, EUA)

- f) Para os ensaios de atividade inseticida e de atividade fitotóxica:
- Surfactante Triton™ X-100 (Vetec/Sigma-Aldrich, San Luiz, MO, EUA)
 - Inseticida Belt® (Bayer, Dormagen, Alemanha)
 - Inseticida Engeo Pleno S (Syngenta, Basiléia, Suíça)
 - Plantas e soja do cultivar BMX Potência RR (Brasmax, Cambé, PR, Brasil)
 - Substrato HT Hortaliças (Vida Verde, Mogi Mirim, SP, Brasil)
 - Adubo NPK 5-20-20 (Heringer, Paulínia, SP, Brasil)

3.2 – Manga (*Mangifera indica*)

3.2.1 – Obtenção e condicionamento de amostras de resíduos de processamento de manga

Diferentes amostras de resíduo de processamento de manga foram obtidas e classificadas de acordo com o modo de obtenção (industrial ou laboratorial), variedade, tipo de cultura e forma de manejo agrícola (orgânico ou convencional). A escolha das amostras se deu pela disponibilidade local, de acordo com interesse econômico e científico envolvido, seja por maior volume de produção no país, seja para desenvolvimento das hipóteses levantadas e dos objetivos deste projeto de pesquisa.

3.2.1.1 – Resíduo de Processamento de Manga obtido a partir de processamento Industrial de manga Orgânica (RPM/IO)

A amostra codificada como RPM/IO foi obtida a partir de uma planta de processamento de sucos parceira localizada em Itirapina-SP. Esta consiste de resíduo gerado no processamento de frutas de manga (*Mangifera indica* L.) da variedade Palmer, proveniente de cultivares de mangueira produzidas sob manejo orgânico, também no município de Itirapina-SP. As amostras foram refrigeradas no local de produção e transportadas até ao laboratório, onde foram imediatamente armazenadas em sacos plásticos em -20 °C até seu devido condicionamento final.

A amostra RPM/IO se caracteriza visualmente pela presença de frações diversas da fruta da mangueira, onde se destacam (Figura 3.1 A): sua casca (epicarpo), de coloração amarelada, avermelhada e esverdeada; o endocarpo exposto, de coloração branca e amarelada e de aspecto fibroso (casca da semente); sua semente (endosperma) triturada, de coloração clara com pontos escuros e aspecto oleoso; todos estes envoltos por uma massa amarelada, consistida

principalmente por frações da polpa (mesocarpo), que ficaram retidas nos filtros das despulpadoras utilizadas no processo. Inicialmente, a amostra tem características variadas e se dá principalmente por uma alta umidade proveniente do processo de despulpamento da fruta.

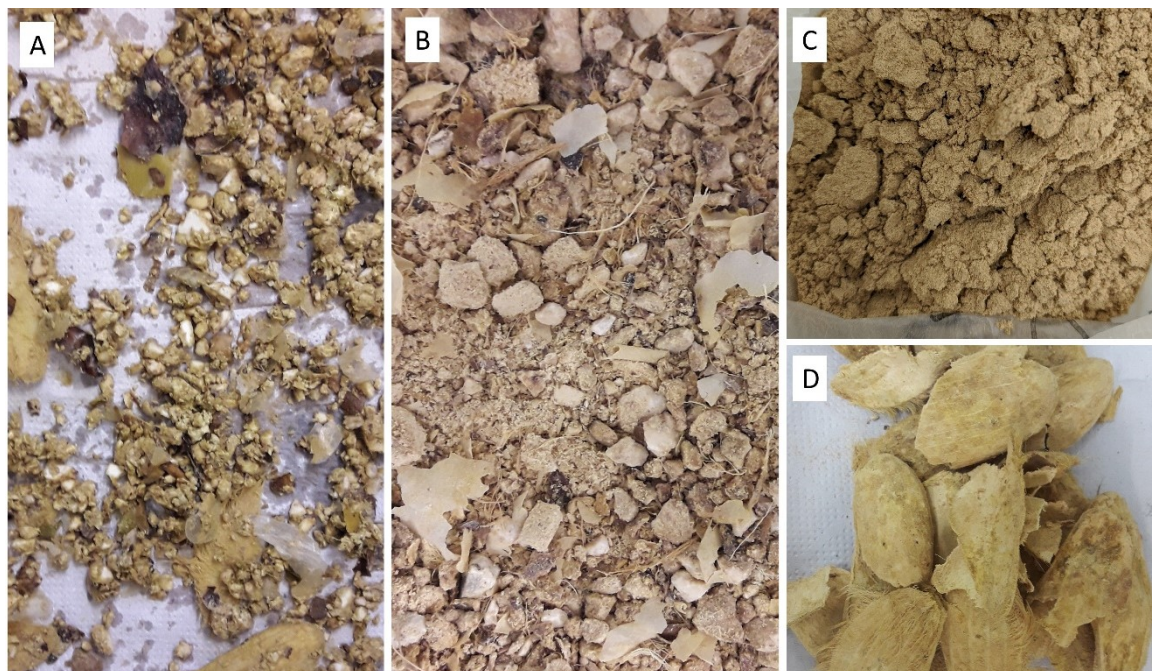


FIGURA 3.1 – Caracterização das amostras de resíduo de processamento de manga (RPM/IO), antes da secagem (A), depois da secagem (B), depois da moagem e peneiramento (C) e parte do endocarpo rejeitado (D).

Devidamente descongelada, a amostra foi homogeneizada e disposta em bandejas de alumínio para secagem em estufa de circulação de ar (Tecnal) à 35 °C. Uma pequena alíquota, disposta uniformemente e de forma semelhante ao restante da amostra, foi separada para observação da evolução da secagem, que foi realizada até que a massa desta alíquota permanecesse constante em um intervalo de 2 horas entre as pesagens. Por conter um alto teor de umidade, a amostra foi regularmente misturada para assegurar total secagem sem correr o risco de contaminá-la por conta da longa exposição. A massa constante foi obtida após 72 horas de secagem, obtendo uma amostra seca com granulometria variada (Figura 3.1 B). A redução de massa observada foi de 57,1%, obtida a partir da pesagem da massa total de amostra antes e depois da secagem. Para homogeneização da granulometria e das diferentes frações da amostra, a mesma foi triturada inicialmente em um moinho de lâminas e posteriormente em moinho analítico (IKA) e finalmente peneirada em

peneira de inox de 35 mesh, de modo a obter partículas menores de 500 µm (Figura 3.1 C). Esta amostra final, utilizada nas extrações, foi armazenada em contêiner de vidro vedado em local protegido da umidade, calor e luz. Por não ser possível realizar a redução do tamanho de partícula das frações celulósicas do endocarpo exposto (casca da semente), este foi manualmente separado da amostra (Figura 3.1 D).

3.2.1.2 – Resíduo de Processamento de Manga obtido a partir de processamento Laboratorial de manga Convencional (RPM/LC)

Frutas de manga da variedade Palmer foram obtidas em um comércio local de São Carlos (SP) e selecionadas de acordo com o grau de maturação a características externas favoráveis (sem machucados, queimaduras ou indícios de doenças usualmente rejeitadas no processamento industrial). As frutas foram levadas ao laboratório, onde foram armazenadas em bandejas plásticas e protegidas por um filme plástico até seu processamento. Com o objetivo de evitar a variação do perfil químico em diferentes amostras devido aos diferentes graus de maturação da fruta, foram utilizadas as diretrizes dadas pela empresa parceira que forneceu a amostra derivada de processamento industrial (RPM/IO), cujo manual de boas práticas fornecido detalha a seleção dos frutos de acordo com a coloração interna da polpa. Os frutos foram selecionados, então, enquanto estavam com a coloração interna completamente amarelada (fruto maduro).

Atingido o grau de maturação necessário, as frutas (Figura 3.2 A) foram lavadas em água corrente para remoção de sujeiras, destroços e demais impurezas, seguido por enxágue em água destilada. Com o auxílio de uma faca de inox, a polpa da fruta foi separada da casca e caroço, com especial atenção para remover a maior quantidade de polpa possível da fração de resíduos. Estes foram fracionados com o auxílio de um processador caseiro (Electrolux), com o objetivo de reduzir o seu volume e auxiliar na abertura do endocarpo, liberando o endosperma (semente) para seu processamento e secagem (Figura 3.2 B). A fração dos resíduos foi armazenada em -20°C para posterior secagem.

A secagem desta amostra foi feita por duas técnicas diferentes. Primeiramente, a secagem em estufa (RPM/LC-E), foi realizada utilizando a mesma metodologia da amostra RPM/IO (ver Item 3.2.1.1). Após seca (Figura 3.2 C), a amostra foi submetida à moagem em moinho analítico (IKA) e peneiração em peneira

de inox de abertura de 500 µm (35 mesh), resultando em uma amostra final recolhida de tamanho de partícula menor do que esta abertura (Figura 3.2 D).

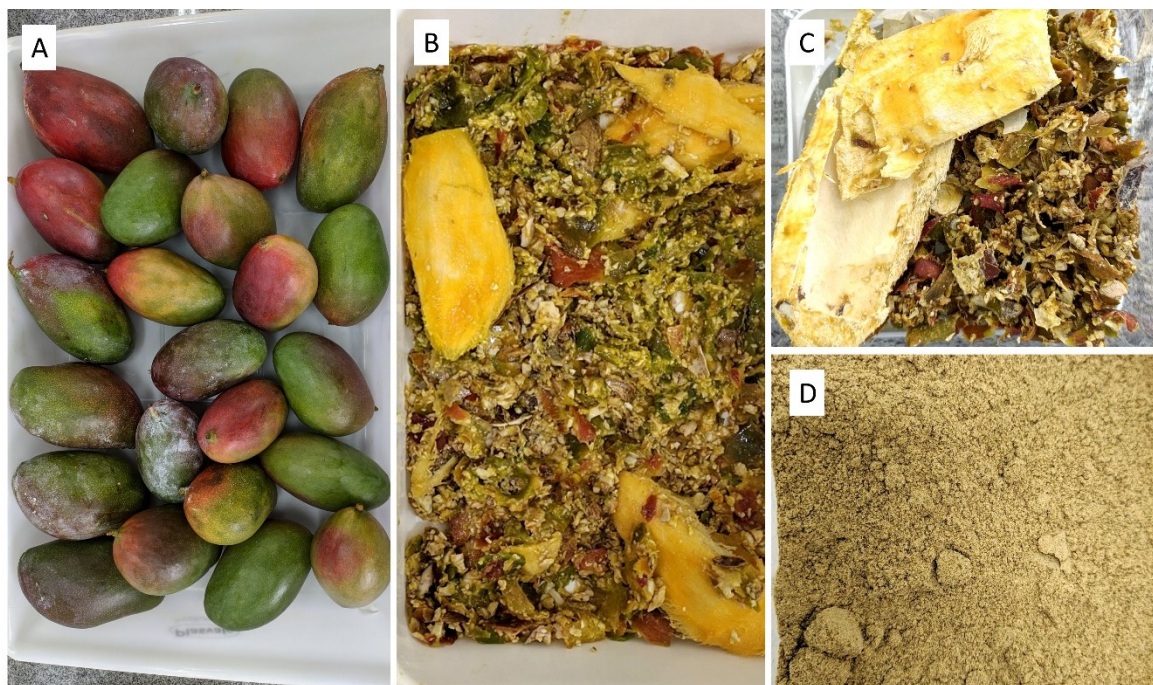


FIGURA 3.2– Caracterização das amostras de resíduo de processamento de manga RPM/LC-E a partir da fruta *in natura* (A), antes da secagem (B), depois da secagem (C), depois da moagem e peneiramento (D).

A partir da fração de resíduo armazenada em -20 °C, também foi realizada a secagem por técnica de liofilização (RPM/LC-L). Desta forma, a amostra congelada foi levada ao liofilizador (Thermo-Fisher) em frascos de polipropileno resistentes, e permaneceu em temperatura de -50 °C e vácuo, até massa constante (medido por alíquota, como nos métodos de secagem anteriores). Após finalização da secagem, as amostras RPM/LC-L foram submetidas ao mesmo processo de moagem e peneiração descritos anteriormente e foram armazenadas em contêiner de vidro vedado, protegidos da luz, calor e umidade.

3.2.1.3 – Resíduo de Processamento de Manga obtido a partir de processamento Laboratorial de manga Orgânica (RPM/LO)

Frutas de manga da variedade Palmer cultivadas sob manejo orgânico foram obtidas em um comércio local de São Carlos (SP), com selo de certificação “Produto Orgânico Brasil”. Elas foram selecionadas de acordo com o grau de maturação a características externas favoráveis (sem machucados, queimaduras ou

indícios de doenças usualmente rejeitadas no processamento industrial). As frutas foram levadas ao laboratório, onde foram armazenadas em bandejas plásticas e protegidas por um filme plástico até seu processamento. O processamento se deu de forma idêntica ao descrito no item anterior (3.2.1.2), com secagem feita apenas em estufa.

3.2.2 – Métodos cromatográficos, curvas analíticas e figuras de mérito

Nesta seção serão descritos os métodos analíticos para detecção e quantificação dos analitos selecionados como marcadores de referência (mangiferina e hiperosídeo) nas amostras de resíduo de processamento das frutas de manga. Por terem sido realizados em locais e equipamentos diferentes, distintos métodos cromatográficos foram realizados para quantificação dos analitos, tornando-os não comparáveis entre si, porém devidamente validados de acordo com as figuras de mérito descritas em cada metodologia. Desta forma, foi possível avaliar os parâmetros de cada extração que permitem a otimização da metodologia de acordo com as variáveis selecionadas para cada método de extração, bem como, ao final, comparação entre as diferentes técnicas de extração e diferentes amostras utilizando a mesma metodologia analítica.

Para fins de avaliação de eficiência de extração, bem como normalizar a variação da concentração dos analitos com base no volume de extrato (mg L^{-1}) causada pelas diferentes proporções amostra-solvente testadas, as respostas obtidas a partir de cada experimento de extração foram calculadas em termos de concentração com base mássica. Desta forma, foi determinada a massa de cada analito obtido, em miligramas, por cada quilograma de amostra (base seca). A concentração dos analitos (C), em miligramas por litro, é estimada a partir da integração das áreas das bandas correspondentes em cada método cromatográfico descrito, utilizando as regressões lineares obtidas nas curvas analíticas para relacionar áreas de banda e concentração. Em seguida, a eficiência de extração (y , em mg kg^{-1}) é calculada de acordo com a seguinte Equação I:

$$\text{Equação I} \quad y [mg \text{ kg}^{-1}] = \frac{C [mg \text{ L}^{-1}] \times V [mL]}{M [g]}$$

sendo:

y = a eficiência de extração;

C = a concentração em base volumétrica;

V = o volume de extrato utilizado em cada extração;

M = a massa de amostra seca utilizada em cada extração.

Vale destacar que o volume de extrato e a massa de amostra em base seca utilizados para o cálculo da eficiência de extração são os mesmos adicionados ao início da extração. Desta forma, para todos métodos aqui descritos, é assumido que não há perdas de massa de amostra e volume de solvente durante a execução da extração, bem como é assumida a homogeneidade da mistura após o término da extração e conseguintes etapas de preparo das amostras para injeção nos sistemas de cromatografia líquida.

3.2.2.1 – Extração Assistida por Homogeneizador em soluções etanólicas (EAH-EtOH)

O método cromatográfico foi obtido no equipamento de UHPLC da Waters, acoplado detector de arranjo de diodos (DAD), utilizando a fase estacionária Acquity HSS C18, com dimensões de 2,1 mm de diâmetro e 100 mm de comprimento e diâmetro de partículas médio de 1.8 µm. A separação foi realizada utilizando água e acetonitrila, com uma vazão de 0,4 mL min⁻¹, volume de injeção de 1 µL, temperatura de coluna de 35 °C e comprimento de onda selecionado de 350 nm. O gradiente de eluição se inicia em uma porcentagem 12% de acetonitrila em água e evolui da seguinte maneira: 0 min, 12%; 5 min, 13%; 7 min, 14%; 15.5 min, 14.5%; 18.5 min, 100%.

Para as curvas analíticas, foram preparadas soluções-estoque dos padrões analíticos de mangiferina e hiperosídeo em concentrações de 800 e 1600 mg L⁻¹, respectivamente, em uma solução etanólica de 65% de etanol em água. Para efeitos de comparação e análise do efeito de matriz na quantificação dos compostos

nas amostras de resíduo de manga, foram realizadas curvas analíticas com e sem a presença da matriz. Logo, para a curva analítica com a presença da matriz, a solução-estoque foi devidamente diluída em uma quantidade fixa de um extrato etanólico de resíduo de manga e complementada com uma solução de 65% de etanol em água até um volume final fixo. Desta forma, todos os pontos da curva analítica na presença da matriz têm a mesma concentração de extrato, porém diferentes concentrações de padrão analítico adicionado. Os extratos utilizados nesta curva analítica foram obtidos a partir das seguintes condições: 65% de etanol em água, razão amostra-solvente de $0,275 \text{ g mL}^{-1}$, 2,75 min de extração e 20.500 rpm de velocidade de rotação, de acordo com os procedimentos utilizados na extração por EAH-EtOH, que serão descritos posteriormente. As concentrações dos padrões utilizadas foram de 400, 200, 100, 50 e 5 mg L^{-1} para ambos analitos, além do branco (apenas o extrato, diluído na mesma proporção). A curva analítica sem a presença da matriz, feita com a leitura dos padrões analíticos apenas em solvente etanólico, foi realizada utilizando as mesmas concentrações, obtidas a partir da diluição da solução-estoque em solução de 65% de etanol em água. Para efeitos de comparação e verificação da influência da matriz, o parâmetro α foi calculado, dividindo o coeficiente angular da regressão linear da curva no solvente pelo da curva no extrato.

A avaliação das figuras de mérito do método analítico foi realizada de acordo com os guias do Conselho Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano, ou ICH na sigla em inglês, detalhada no documento “*Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*”¹⁸⁰, como já descrito na introdução desta tese. Foram realizados os cálculos das curvas analíticas utilizando uma regressão linear de acordo com o método dos mínimos quadrados, a partir da função “INCLINAÇÃO” e “INTERCEPTAÇÃO” do software Microsoft Office Excel, onde os valores de y conhecidos foram inseridos como as áreas das bandas obtidas no método cromatográfico e os valores de x conhecidos, as respectivas concentrações conhecidas dos analitos em cada ponto. Para determinação da linearidade, a função “CORREL” foi utilizada para o cálculo do coeficiente de correlação da regressão linear (R^2). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), foram calculados a partir da Equação II e da Equação III:

$$\text{Equação II} \quad LD = \frac{3,3\sigma}{S}$$

$$\text{Equação III} \quad LQ = \frac{10\sigma}{S}$$

sendo:

σ = o desvio padrão da resposta;

S = a inclinação da curva analítica.

Logo, os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir dos valores de σ obtidos a partir da função "PROJ.LIN" do Excel e valores de S obtidos a partir da função "INCLINAÇÃO", como previamente descrito.

Seguindo as figuras de mérito, o parâmetro de especificidade foi determinado pela identificação das bandas dos analitos e sua eficiente separação cromatográfica. Para isto, foram utilizados o perfil de absorção ultravioleta (UV) obtido a partir do detector de arranjo de diodos (DAD). Os espectros de UV e o tempo de retenção das bandas investigadas foram comparados aos obtidos ao injetar os padrões analíticos de mangiferina e hiperosídeo sob mesmo método de eluição. Para avaliação da pureza das bandas, foi observada a variação do perfil UV dos compostos selecionados presentes no extrato em diferentes pontos da banda. Além disso, também foram obtidos cromatogramas dos extratos-teste com a adição dos padrões analíticos (extratos fortificados), observando o aumento da área das bandas investigadas.

Por se tratar de uma matriz complexa, onde não é possível se obter uma matriz branca sem a presença dos analitos, o parâmetro de exatidão foi calculado em termos de um ensaio de recuperação, onde diferentes concentrações de padrões analíticos são adicionadas ao extrato sólido, antes de realizar os procedimentos de extração. Após a realização da extração, os extratos obtidos são analisados e as áreas das bandas são calculadas e subtraídas as áreas das bandas dos extratos brancos, realizados sob os mesmos parâmetros de extração, porém sem adição de padrões analíticos. Desta forma, foi possível calcular a concentração encontrada dos padrões adicionados, recuperada após a extração. Para este ensaio, foram utilizadas as

concentrações de 30, 50, 100 e 150 mg L⁻¹ de cada analito, que foram adicionadas ao extrato e seguidas por extração de acordo com a metodologia de extração EAH-EtOH.

Por fim, o parâmetro de precisão foi determinado a partir dos erros inter-diários e intra-diários das áreas das bandas obtidos nos ensaios de recuperação descritos acima. Para isso, foram comparadas as áreas obtidas em três injeções diferentes realizadas em um mesmo dia (erro intra-diário) e entre três injeções realizadas em três dias diferentes e consecutivos (erro inter-diário). Estes erros foram representados em termos percentuais do coeficiente de variação obtido entre as injeções, de acordo com a Equação IV.

$$\text{Equação IV} \quad CV (\%) = \frac{DP}{\bar{X}} \cdot 100$$

sendo:

CV = o coeficiente de variação;

DP = o desvio padrão entre as replicatas;

\bar{X} = a média entre as replicatas.

3.2.2.2 – Extração Assistida por Micro-ondas (EAM), Dispersão de Matriz em Fase Sólida (DMFS) e demais análises

Por conta de uma perda de seletividade e eficiência de separação das bandas cromatográficas utilizando o método descrito na seção anterior (Item 3.2.2.1), um novo método cromatográfico foi obtido, utilizando o mesmo equipamento de cromatografia líquida (UHPLC Waters). Este método foi utilizado para a otimização dos parâmetros de extração assistida por micro-ondas (EAM) e dispersão de matriz em fase sólida (DMFS), além das demais análises de comparação final entre diferentes amostras.

A fase estacionária utilizada para separação dos compostos foi a Acquity BEH C8, (1,7 µm; 2,1 x 50 mm), com temperatura de 35 °C, onde foi injetado 1 µL das soluções testadas, com um gradiente de eluição utilizando água (com 0,1% de ácido fórmico) e metanol a 0,4 mL min⁻¹. O gradiente se iniciou em 10% de metanol em água e se deu da seguinte forma: 0 min, 10%; 1 min, 20%; 3.5 min, 28%; 9.5 min 40%; e

10.5 min 100%. Os cromatogramas foram obtidos utilizando o comprimento de onda de 350 nm, nos quais as áreas das bandas foram calculadas para quantificação dos analitos.

Soluções-estoque de 500 mg L⁻¹ de mangiferina e hiperosídeo foram preparadas pesando as massas dos padrões necessárias, diluídas em 65% etanol em água. A partir desta solução-estoque, foram preparados os pontos de concentração para as curvas analíticas, também realizados com e sem a presença da matriz. Desta forma, as soluções-estoque foram diluídas para formar soluções de 300, 200, 100, 50 e 10 mg L⁻¹ de ambos analitos, utilizando a mesma metodologia explicitada na seção anterior. Estas soluções foram injetadas no sistema de UHPLC em triplicata. Desta forma, a média da triplicata das áreas das bandas de cada composto foi determinada e correlacionada com sua concentração obtida a partir da diluição da solução-estoque.

A regressão linear, bem como os parâmetros de linearidade e limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com os métodos já descritos na seção anterior (Item 3.2.2.1). Os parâmetros de seletividade também foram avaliados da mesma forma descrita na seção anterior, assim como também foram realizados os ensaios de recuperação com adição de padrão à matriz antes da extração, para determinação da exatidão, e cálculo dos erros intra- e inter-diários para determinação da precisão do método analítico. Para avaliação da recuperação e cálculo dos erros intra- e inter-diários, foram realizadas triplicatas (para cada técnica de extração) em dois níveis de concentração dos analitos: 20 e 50 mg L⁻¹. A metodologia do ensaio de recuperação e do cálculo de recuperação e erros intra- e inter-diários foi a mesma descrita no item 3.2.2.1.

3.2.2.3 – Extração Assistida por Homogeneizador em soluções de líquidos iônicos (EAH-LIs)

Esta parte do estudo, onde foi investigado o uso de soluções aquosas de líquidos iônicos para extração de mangiferina e hiperosídeo a partir de resíduos de manga, foi realizada em período de estágio no exterior na Universidade de Leuphana, em Lüneburg, Alemanha. Desta forma, um novo método cromatográfico foi desenvolvido utilizando o sistema disponível no local, e conseqüentemente uma nova curva de analítica foi realizada utilizando a nova metodologia. O sistema de cromatografia líquida utilizado foi o HPLC da Shimadzu, acoplado a um detector UV

de arranjo de diodos (DAD). A separação foi feita utilizando a fase estacionária Nucleodur C8 (3 μm ; 2x125 mm), com um volume de injeção de 2 μL , temperatura da coluna de 35 $^{\circ}\text{C}$ e comprimento de onda de detecção de 350 nm. O gradiente de eluição foi realizado com um fluxo de 0,3 mL min^{-1} , com início em 10% de metanol em água (com 0,1% de ácido fórmico), evoluindo da seguinte forma: 0 min, 10%; 4 min, 20%; 14 min, 30%; 21 min, 40%; 24 min, 100%; 29 min, 100%; 30 min, 10%; 40 min, 10%.

As soluções estoques foram preparadas em concentrações de 200 mg L^{-1} dos padrões de mangiferina e hiperosídeo, diluídas em uma solução 1 mol L^{-1} de $[\text{C}_4\text{MIm}] \text{Br}$ em água. A solução-estoque foi diluída utilizando a mesma solução do LI de modo a obter soluções de 150, 100, 75, 50, 25, 10, 5 e 1 mg L^{-1} dos padrões, i.e. apenas curva analítica sem a presença da matriz. Estas soluções foram injetadas no sistema de cromatografia líquida, e as áreas das bandas relativas a cada composto foram calculadas de forma a constituir a curva analítica.

O cálculo da regressão linear da curva analítica, dos parâmetros de linearidade e os limites de detecção e quantificação foi realizado da mesma forma descrita no item 3.2.2.1. Para a seletividade, foram utilizadas as comparações dos tempos de retenção e perfil ultravioleta das bandas investigadas com os padrões analíticos dos analitos, bem como a comparação dos cromatogramas dos extratos e extratos fortificados com os padrões.

3.2.3 – *Extrações e planejamentos fatoriais*

Nesta seção serão apresentadas as metodologias de extração e preparo das amostras de extratos líquidos obtidos a partir de diferentes técnicas, que foram posteriormente analisadas utilizando os procedimentos descritos na seção anterior (3.2.2). No caso dos ensaios de otimização das extrações utilizando as técnicas com homogeneizador (EAH-EtOH e EAH-LIs), micro-ondas (EAM) e DMFS, a amostra RPM/IO foi utilizada. Já os ensaios comparativos de diferentes métodos de secagem foram realizados com a amostra RPM/LC.

3.2.3.1 – Extração Assistida por Homogeneizador em soluções etanólicas (EAH-EtOH)

As variáveis selecionadas para as extrações utilizando EAH-EtOH, bem como os níveis de máximo (+1), mínimo (-1) e ponto central (CP), estão listados na Tabela 3.1. As amostras foram pesadas de acordo com a variável X_2 e adicionadas a um tubo do tipo *Falcon* de 15 mL, seguida pela adição de 5 mL do respectivo solvente, de acordo com a variável X_1 . A extração foi realizada utilizando o equipamento dispersor (IKA, Figura 3.3) configurado em velocidade no nível 5 (20.500 rpm), pelo tempo definido pela variável X_3 . A mistura resultante foi então centrifugada e o líquido sobrenadante coletado, filtrado em filtro de seringa de membrana PTFE de 0,45 μm (Analítica) e direcionado para análise cromatográfica.

TABELA 3.1 – Variáveis utilizadas na extração de resíduos de processamento de manga utilizando a técnica por EAH-EtOH.

Símbolo	Variáveis	Variáveis codificadas		
		Mín. (-1)	PC (0)	Máx. (+1)
X_1	% Etanol/Água (%v/v)	30	55	80
X_2	Amostra-Solvente (g mL^{-1})	0,15	0,33	0,50
X_3	Tempo (min)	0,5	2,75	5

PC = Ponto Central



FIGURA 3.3– Equipamento de extração por EAH em procedimento de extração de resíduo de processamento de manga.

Estas variáveis e seus níveis codificados foram utilizados para o planejamento fatorial do tipo *Box-Behnken Design* (BBD), como mostrado na Tabela 3.2. Os experimentos foram ordenados de forma aleatória e realizados de acordo com metodologia descrita acima.

TABELA 3.2 – Planejamento fatorial BBD para a otimização da extração de resíduos de processamento de manga utilizando a técnica por EAH-EtOH.

	Etanol/Água (X_1)		Amostra-Solvente (X_2)		Tempo (X_3)	
	% v/v		g mL ⁻¹		min	
Exp.	Cod.	Real	Cod.	Real	Cod.	Real
1	-1	30	-1	0,15	0	2,75
2	1	80	-1	0,15	0	2,75
3	-1	30	1	0,50	0	2,75
4	1	80	1	0,50	0	2,75
5	-1	30	0	0,33	-1	0,50
6	1	80	0	0,33	-1	0,50
7	-1	30	0	0,33	1	5,00
8	1	80	0	0,33	1	5,00
9	0	55	-1	0,15	-1	0,50
10	0	55	1	0,50	-1	0,50
11	0	55	-1	0,15	1	5,00
12	0	55	1	0,50	1	5,00
13	0	55	0	0,33	0	2,75
14	0	55	0	0,33	0	2,75
15	0	55	0	0,33	0	2,75

3.2.3.2 – Extração Assistida por Micro-ondas (EAM)

A extração assistida por micro-ondas foi possível utilizando o equipamento Ethos X, sistema de micro-ondas para uso laboratorial com o acessório FastEX para extração de até 24 frascos de 100 mL em sistema aberto. Quatro variáveis foram selecionadas para avaliação de seus efeitos e otimização da metodologia de extração por micro-ondas (Tabela 3.3).

TABELA 3.3 – Variáveis estudadas para a extração de resíduos de processamento de manga por EAM.

Símbolo	Variáveis reais	Variáveis codificadas		
		Min (-1)	PC (0)	Max (+1)
X_1	% Etanol/Água (%v/v)	75,0	82,5	90,0
X_2	Amostra-Solvente (g mL ⁻¹)	0,15	0,33	0,50
X_3	Tempo da isoterma (min)	2	6	10
X_4	Temperatura (°C)	40	55	70

PC=Ponto Central

As amostras foram pesadas de acordo com a razão amostra-solvente (X_2) de cada experimento e adicionadas ao tubo de vidro de 100 mL, juntamente com 10 mL de solvente, de acordo com a variável X_1 . O tubo de vidro foi então inserido em um frasco de teflon, fechado e inserido no equipamento. Tempo e temperatura foram então selecionados no controlador do equipamento de acordo com cada experimento do planejamento fatorial. Quando em operação, o equipamento mede a temperatura dos frascos (através de um sensor infravermelho) e define a potência necessária para atingir a temperatura definida pelo programa, sendo a potência máxima a ser aplicada limitada a 1,000 Watts. O gradiente de temperatura se deu da seguinte forma para todos os experimentos: 5 minutos de rampa da temperatura ambiente até a temperatura final (X_4); tempo de isoterma, definido pelo planejamento fatorial (X_3); e 10 minutos de resfriamento. Os frascos foram retirados do equipamento e deixados para resfriamento até temperatura ambiente em uma capela. O líquido foi então vertido em um frasco *Falcon* de 15 mL e levado à centrifugação por 5 minutos a 8.000 rpm e temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e filtrado através de um filtro de seringa de PTFE de 0,45 μm (Analítica), seguido pela injeção no sistema de UHPLC.

Para análise dos efeitos das variáveis e cálculo do modelo polinomial para metodologia de superfície de resposta, um planejamento fatorial de *Box-Behnken* foi utilizado. Desta forma, 27 experimentos foram realizados de forma a obter uma avaliação eficiente dos efeitos independentes de cada variável, bem como suas interações entre si. Os detalhes destes experimentos, realizados em ordem aleatória, estão listados na Tabela 3.4.

TABELA 3.4 – Planejamento fatorial *Box-Behnken* para a extração de resíduos de processamento de manga utilizando EAM.

Exp.	Etanol/Água (X ₁)		Amostra-Solvente (X ₂)		Tempo (X ₃)		Temperatura (X ₄)	
	% v/v		g mL ⁻¹		min		°C	
	Cod.	Real	Cod.	Real	Cod.	Real	Cod.	Real
1	-1	75,0	-1	0,15	0	6	0	55
2	1	90,0	-1	0,15	0	6	0	55
3	-1	75,0	1	0,50	0	6	0	55
4	1	90,0	1	0,50	0	6	0	55
5	-1	75,0	0	0,33	-1	2	0	55
6	1	90,0	0	0,33	-1	2	0	55
7	-1	75,0,0	0	0,33	1	10	0	55
8	1	90,0	0	0,33	1	10	0	55
9	-1	75,0	0	0,33	0	6	-1	40
10	1	90,0	0	0,33	0	6	-1	40
11	-1	75,0	0	0,33	0	6	1	70
12	1	90,0	0	0,33	0	6	1	70
13	0	82,5	-1	0,15	-1	2	0	55
14	0	82,5	1	0,50	-1	2	0	55
15	0	82,5	-1	0,15	1	10	0	55
16	0	82,5	1	0,50	1	10	0	55
17	0	82,5	0	0,33	-1	2	-1	40
18	0	82,5	0	0,33	1	10	-1	40
19	0	82,5	0	0,33	-1	2	1	70
20	0	82,5	0	0,33	1	10	1	70
21	0	82,5	-1	0,15	0	6	-1	40
22	0	82,5	1	0,50	0	6	-1	40
23	0	82,5	-1	0,15	0	6	1	70
24	0	82,5	1	0,50	0	6	1	70
25	0	82,5	0	0,33	0	6	0	55
26	0	82,5	0	0,33	0	6	0	55
27	0	82,5	0	0,33	0	6	0	55

3.2.3.3 – Extração por Dispersão de Matriz em Fase Sólida (DMFS)

As extrações se deram inicialmente pela pesagem de uma quantidade variável do sorbente escolhido, de acordo com a variável X₁ e X₃, cujos níveis selecionados podem ser visualizados na Tabela 3.5. Em um almofariz de cerâmica, foi adicionado 1% (m/v) do solvente de eluição utilizado em cada procedimento para desativação do sorbente, com o objetivo de facilitar e permitir a eluição dos compostos de interesse. A mistura foi homogeneizada com um pistilo de cerâmica, seguida pela adição da amostra em quantidade fixa de 0,5 g. A mistura amostra-sorbente passa por etapa de homogeneização por maceração em um tempo de 5 minutos com o pistilo. A mistura final é transferida para uma seringa de vidro de 5 mL, com papel filtro ao fundo, suavemente comprimida e fechada com papel no topo. Esta seringa é então

inserida em um coletor de extração em fase sólida (*manifold*), com adição de 5 mL do solvente escolhido para cada extração (variável X_2 , Tabela 3.5) para eluição, auxiliada pelo uso de uma bomba de vácuo. Este sistema pode ser visualizado na Figura 3.4. O líquido de eluição coletado na câmara do coletor é filtrado em membrana PTFE de 0,45 μm (Analítica) e segue para a análise em sistema de UHPLC.

TABELA 3.5 – Variáveis estudadas para a extração por DMFS.

Símbolo	Variáveis reais	Variáveis codificadas		
		Mín. (-1)	PC (0)	Máx. (+1)
X_1	Amostra-Sorbente (%m/m)	25	62,5	100
X_2	Etanol/Água (%v/v)	40	62,5	85
X_3	Sorbente	C18	-	Florisil

PC=Ponto Central



FIGURA 3.4– Sistema de extração por DMFS para extrato de manga.

Com as variáveis selecionadas, foi utilizado o planejamento fatorial de *Doehlert* duplicado, considerando um planejamento separado para cada um dos sorbentes (Florisil e C18). Este planejamento resultou em 18 experimentos (9 para cada sorbente), que foram realizados em ordem aleatória, como pode ser visto na Tabela 3.6.

TABELA 3.6 – Planejamento fatorial do tipo *Doehlert* duplicado para a extração de resíduos de processamento de manga utilizando DMFS.

Exp.	Amostra-Sorbente (X ₁)		Etanol/Água (X ₂)		Sorbente (X ₃)	
	Cod.	Real	Cod.	Real	Cod.	Real
		% m/m		% v/v		-
1	0	62,5	0	62,5	1	Florisil
2	0	62,5	0	62,5	1	Florisil
3	0	62,5	0	62,5	1	Florisil
4	1	100,0	0	62,5	1	Florisil
5	0,5	81,3	0,866	82,0	1	Florisil
6	-1	25,0	0	62,5	1	Florisil
7	-0,5	43,8	-0,866	43,0	1	Florisil
8	0,5	81,3	-0,866	43,0	1	Florisil
9	-0,5	43,8	0,866	82,0	1	Florisil
10	0	62,5	0	62,5	-1	C18
11	0	62,5	0	62,5	-1	C18
12	0	62,5	0	62,5	-1	C18
13	1	100,0	0	62,5	-1	C18
14	0,5	81,3	0,866	82,0	-1	C18
15	-1	25,0	0	62,5	-1	C18
16	-0,5	43,8	-0,866	43,0	-1	C18
17	0,5	81,3	-0,866	43,0	-1	C18
18	-0,5	43,8	0,866	82,0	-1	C18

3.2.3.4 – Extração Assistida por Homogeneizador em soluções de líquidos iônicos (EAH-LIs)

Goçando da disponibilidade de diversas fontes de LIs, bem como a discussão teórica e prática sobre seu caráter verde e sua biodegradabilidade, a parceria com o grupo de pesquisa do *Institute of Sustainable and Environmental Chemistry* na Universidade de Leuphana, em Lüneburg (Alemanha), se deu principalmente na avaliação do uso prático destes solventes para extração de bioativos a partir de resíduos de manga. Para isso, testes de triagem de diversas formas de LIs foram realizadas, utilizando a técnica de extração por homogeneizador como base para uma eficiente extração e também como comparação com os métodos desenvolvidos utilizando misturas de água e etanol.

As amostras foram pesadas de acordo com a relação amostra-solvente de cada experimento e transferidas para um tubo de plástico de 15 mL contendo 5 mL do solvente selecionado. A extração foi realizada utilizando o equipamento homogeneizador (IKA T25) na velocidade de 16.000 rpm. Nos testes de triagem, a extração foi feita com parâmetros fixados em 10 minutos e razão amostra-solvente de

0,1 g mL⁻¹. Ao fim das extrações, as misturas foram centrifugadas por 10 minutos a 4.000 rpm (Hettich Rotanta 460) e o sobrenadante foi coletado e filtrado usando um filtro de seringa de PTFE de 0,45 µm (Chromafil), seguindo para análise por HPLC.

a) Triagem dos líquidos iônicos

A seleção dos líquidos iônicos e solventes escolhidos para os testes de triagem (Tabela 3.7) foi realizada de acordo com a disponibilidade dos mesmos, bem como a seleção de um diverso tipo de ânions e cátions que constituem estes LIs. Um dos fatores importantes para a consideração da relevância do uso destes LIs de forma sustentável na extração de compostos bioativos é a sua biodegradabilidade, visto que a recuperação (ou reciclagem) dos líquidos iônicos, apesar de possível, é um processo custoso e demandante de energia e materiais. Desta forma, foram utilizados testes de biodegradabilidade (CBT) realizados no próprio instituto de pesquisa parceiro para seleção dos compostos de triagem e tomada de decisão para os próximos testes de otimização. Todos os LIs foram preparados em soluções de concentrações de 1 mol L⁻¹ em água ultrapura (tipo 1). Extrações com etanol/água 70%_{v/v} foram realizadas em triplicata com objetivo comparativo com as extrações otimizadas anteriormente com a técnica de homogeneizador (EAH-EtOH), como será relatado, sendo essa mistura considerada o melhor meio líquido para extração de mangiferina e hiperosídeo utilizando esta técnica. As significâncias estatísticas das diferenças entre as médias obtidas com cada meio extrator foram avaliadas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$), individualmente entre cada analito.

TABELA 3.7 – Soluções selecionadas para o teste de triagem.

Nº	Solvente	Biodegradabilidade
1	Brometo de 1-etilpiridínio	52% 17%
2	Brometo de 1-butil-1-metilpirrolidínio - [C ₄ MPyrr] Br	2%
3	Cloreto de 1-octil-3-metilimidazólio - [C ₈ MIm] Cl	2%
4	Acetato de colina	84%
5	Formato de 2-hidroxietilamônio	61%
6	Brometo de 1-etil-3-metilimidazólio - [C ₂ MIm] Br	-4%
7	Brometo de 1-butil-3-metilimidazólio - [C ₄ MIm] Br	3%
8	Brometo de 1-hexil-3-metilimidazólio - [C ₆ MIm] Br	3%
9	Brometo de 1-octil-3-metilimidazólio - [C ₈ MIm] Br	3%
10	Brometo de 1-decil-3-metilimidazólio - [C ₁₀ MIm] Br	2%

b) Otimização da extração por EAH-LIs utilizando [C₈MIm] Cl e acetato de colina

Para ambos os líquidos iônicos selecionados para o aprofundamento dos estudos de extração, a otimização foi realizada utilizando um planejamento fatorial de *Box-Behnken*, utilizando três parâmetros de avaliação (concentração do líquido iônico, tempo de extração e razão amostra-solvente), como pode ser visto na Tabela 3.8.

TABELA 3.8 – Variáveis estudadas para a otimização da extração por EAH-LIs utilizando [C₈MIm] Cl e Acetato de Colina

Símbolo	Variáveis reais	Variáveis codificadas		
		Min (-1)	PC (0)	Max (+1)
X ₁	Concentração do Líquido Iônico (mol L ⁻¹)	0,2	1,1	2,0
X ₂	Tempo (min)	5,0	17,5	30,0
X ₃	Amostra-solvente (g mL ⁻¹)	0,05	0,10	0,15

PC=Ponto Central

O planejamento fatorial para a otimização da extração EAH-LIs utilizando soluções de [C₈Mim] Cl e acetato de etila como solventes pode ser visto na Tabela 3.9. Para cada um dos dois LIs foram realizados, em ordem aleatória, os 15 experimentos descritos para otimização dos parâmetros selecionados.

TABELA 3.9 – Planejamento fatorial de *Box-Behnken* para otimização da extração de EAH-LIs em resíduos de processamento de manga utilizando [C₈Mim] Cl como solvente.

Exp.	Conc. do LI (X ₁)		Tempo (X ₂)		Amostra-solvente (X ₃)	
	Cod.	Real	Cod.	Real	Cod.	Real
1	0	1,1	0	17,5	0	0,10
2	0	1,1	0	17,5	0	0,10
3	0	1,1	0	17,5	0	0,10
4	-1	0,2	-1	5,0	0	0,10
5	-1	0,2	1	30,0	0	0,10
6	1	2,0	-1	5,0	0	0,10
7	1	2,0	1	30,0	0	0,10
8	-1	0,2	0	17,5	-1	0,05
9	-1	0,2	0	17,5	1	0,15
10	1	2,0	0	17,5	-1	0,05
11	1	2,0	0	17,5	1	0,15
12	0	1,1	-1	5,0	-1	0,05
13	0	1,1	-1	5,0	1	0,15
14	0	1,1	1	30,0	-1	0,05
15	0	1,1	1	30,0	1	0,15

3.2.4 – *Comparação entre diferentes métodos de secagem*

Para comparação entre os métodos de secagem em estufa e por liofilização, foram realizados experimentos em triplicata utilizando a metodologia de extração assistida por homogeneizador em soluções etanólicas (EAH-EtOH). As amostras RPM-LC de cada técnica de secagem foram pesadas (0,9 g) e transferidas para um tubo *Falcon* de 15 mL, onde foram adicionados 3 mL de solução de etanol 70% (v/v) em água. O tempo de extração foi de 5 minutos com velocidade 20.500 rpm (IKA T10 Basic). A mesma metodologia de extração e preparo de amostra descrita no item 3.2.3.1 foi utilizada. Para a comparação entre as médias e determinação das diferenças significativas, foi realizado o teste de Tukey ($p < 0,05$) individualmente para cada analito.

Para avaliação do perfil químico das amostras obtidas a partir de diferentes métodos de secagem, foram realizadas corridas cromatográficas exploratórias com o objetivo de obter cromatogramas que contemplem todo o gradiente de eluição. Estas leituras foram feitas no UHPLC da Waters, com os mesmos parâmetros realizados para o método de quantificação descrito no item 3.2.2.2. O gradiente de eluição também foi realizado com água acidificada com ácido fórmico (0,1%) e metanol, e evoluiu da seguinte forma: 0 min, 10% de metanol; 2 min, 10%; 22 min, 45%; 23 min, 100%; 26min, 100%.

3.2.5 – *Comparação entre diferentes amostras*

Assim como na comparação entre diferentes métodos de secagem, também foram feitas análises comparativas entre as diferentes amostras de resíduos de manga obtidas. Estes ensaios foram realizados em triplicata, também utilizando o método de extração por homogeneizador em mistura de etanol e água (EAH-EtOH). Os parâmetros foram os mesmos do teste anterior (0,3 g mL⁻¹, 70% etanol/água, 5 minutos), que também foi analisado da mesma forma para quantificação de mangiferina e hiperosídeo, bem como para obtenção de um cromatograma exploratório, já descrito no item 3.2.4. Assim como no ensaio anterior, as médias foram comparadas de acordo com teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.3 – Goiaba (*Psidium guajava*)

3.3.1 – Obtenção e condicionamento de amostras de resíduos de processamento de goiaba

Diferentes amostras de resíduos de processamento da fruta de goiaba (*Psidium guajava*) foram obtidas, de acordo com a disponibilidade local, bem como interesse científico e ensaios necessários para discussão das hipóteses levantadas. Neste item serão apresentados os métodos de obtenção e condicionamento destas amostras para posterior extração e análise.

3.3.1.1 – Resíduo de Processamento de Goiaba obtido a partir de processamento Laboratorial de goiaba Orgânica (RPG/LO)

Frutas de goiaba (*Psidium guajava*) foram obtidas no comércio local especializado em produtos orgânicos em São Carlos (SP), identificadas como derivadas de produção orgânica, com selo de certificação “Produto Orgânico Brasil”. Não foram disponibilizadas informações sobre a variedade da espécie de goiaba. As frutas foram selecionadas de forma a rejeitar sinais evidentes de machucados, queimaduras e doenças, bem como um estado de maturação uniforme. Estas foram levadas ao laboratório, onde ficaram armazenadas em bandejas de plásticos, cobertas por plástico filme, até apresentarem coloração externa amarelada, corte fácil, consistência macia e coloração interna predominantemente avermelhada, características da fruta madura (Figura 3.5 A).

As frutas foram higienizadas em água corrente para remoção de sujeiras, seguido por enxágue com água destilada. Após secas, elas foram cortadas com o auxílio de uma faca de aço inox e seguiram para processamento em um processador doméstico (Electrolux) (Figura 3.5 B), formando uma massa de aspecto pastoso composta por todas as partes da fruta. Espelhando o processamento industrial para produção de polpa de goiaba, esta pasta foi coada com o auxílio de uma peneira doméstica de abertura média de 0,5 mm (Figura 3.5 C). A polpa de goiaba, utilizada para produção de sucos, doces e outros produtos alimentícios, foi recolhida e armazenada. A fração retida na peneira, i.e., a amostra de resíduo de processamento de goiaba, é consistida basicamente pelas sementes, partes da casca e porções não-solúveis e de aspecto fibroso da polpa, e foi recolhida para posterior secagem e adequação.

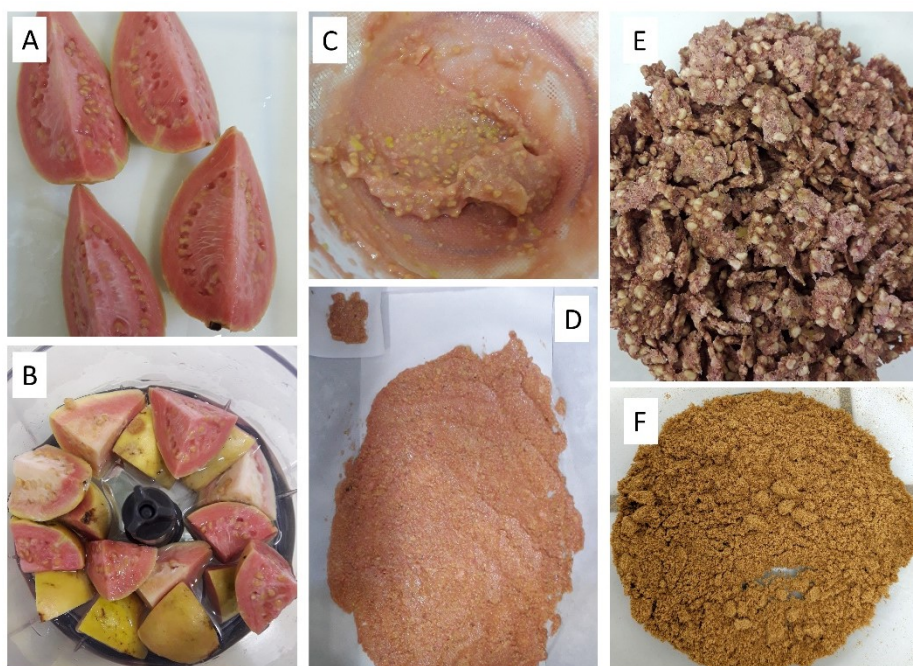


FIGURA 3.5– Caracterização das amostras de resíduo de processamento de goiaba RPG/LO a partir da fruta *in natura* (A), antes do processamento (B), depois do processamento e passando pelo processo de coagem (C), levada à secagem (D), após secagem (E) e amostra final após moagem e peneiração (F).

A amostra seguiu direto para secagem em estufa de circulação de ar (Tecnal), feita em bandejas de aço, onde a amostra foi espalhada sobre uma camada de papel antiaderente (Figura 3.5 D). Assim como feito nas amostras de manga, uma porção da amostra foi separada como alíquota para acompanhamento da variação da massa durante a secagem. Massa constante foi detectada em um intervalo de 2 horas após 48 horas de secagem, obtendo a amostra seca (Figura 3.5 E). Esta então seguiu para moagem em moinho analítico (IKA), seguido por peneiração em peneira de inox de abertura de 35 mesh (500 μm), obtendo a amostra final em estado sólido com tamanho de partícula padronizado em $\leq 500 \mu\text{m}$ (Figura 3.5 F). Esta amostra foi armazenada em contêiner vedado de vidro, em local protegido da luz, calor e umidade.

3.3.1.2 – Resíduo de Processamento de Goiaba obtido a partir de processamento Laboratorial de goiaba Convencional (RPG/LC)

Frutas de goiaba (*Psidium guajava*) foram obtidas no comércio local em São Carlos (SP), identificadas como derivadas de produção convencional. Também não foram disponibilizadas informações sobre a variedade da espécie de goiaba. As

frutas foram selecionadas de forma a rejeitar sinais evidentes de machucados, queimaduras e doenças, bem como um estado de maturação uniforme (Figura 3.6 A). O armazenamento, processamento e condicionamento da amostra de resíduo de processamento de goiaba se deu da mesma forma descrita na seção anterior (Item 3.3.1.1). Diferentemente da amostra RPG/LO, a secagem da amostra RPG/LC se deu por duas formas diferentes. A primeira com a técnica de secagem em estufa de circulação de ar (Tecnal), como descrito na seção anterior, codificada aqui como RPG/LC-E. A segunda se deu pela utilização da técnica de liofilização (RPG/LC-L). Após o processamento da fruta, a fração retida na peneira (Figura 3.6 B) foi transferida para recipientes de polipropileno resistente e congelada em -20 °C. Após 24 horas, as amostras foram levadas ao equipamento de liofilização (Thermo-Fisher), onde são submetidas a uma temperatura de -50 °C e vácuo. As amostras foram submetidas a este processo até obterem massa constante, medida por meio de alíquotas (Figura 3.6 C). Após secagem, as amostras liofilizadas foram submetidas ao mesmo processo de moagem e peneiração descrito na seção anterior, obtendo a amostra final (Figura 3.6 D).

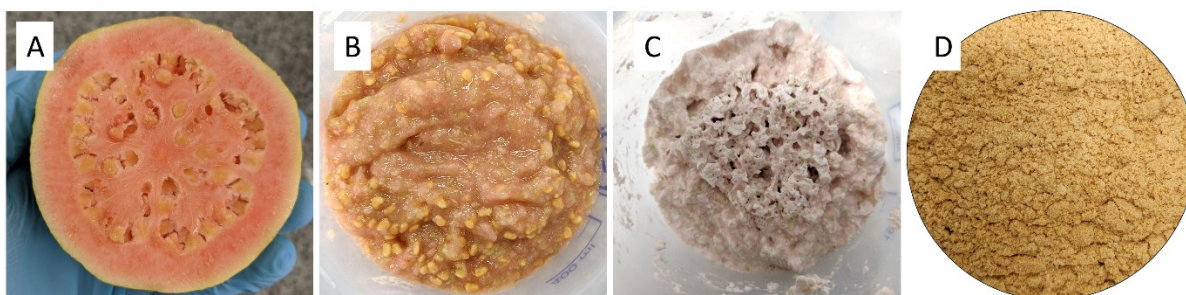


FIGURA 3.6– Caracterização das amostras de resíduo de processamento de goiaba RPG/LC-L a partir da fruta *in natura* (A), após processamento (B), após secagem por liofilização (C) e amostra final após moagem e peneiração (D).

3.3.2 – Métodos cromatográficos, curvas analíticas e figuras de mérito

Assim como ocorreu para as amostras de manga, foi desenvolvido mais de um método analítico para detecção e quantificação de vanilina e quercetina a partir de amostras de resíduo de processamento de goiaba. Um ensaio inicial mais amplo, como estudo de conceito, foi feito em período de estágio no exterior na Universidade de Leuphana, na Alemanha, com a técnica de extração assistida por homogeneizador

(EAH), utilizando soluções etanólicas com a presença de ácido clorídrico. Em seguida, por necessitar de tempos mais longos de extração, a técnica de extração assistida por ultrassom (EAU) foi estudada como modelo ideal para esta proposta. De volta ao Brasil, outra metodologia analítica foi desenvolvida para detecção e quantificação dos mesmos analitos nas amostras obtidas com a EAU e demais análises. Estas metodologias serão descritas nesta seção. As respostas dos experimentos foram calculadas em termos de eficiência de extração dos marcadores de referência selecionados para a goiaba (quercetina e vanilina), em base mássica (mg kg^{-1}), obtidas seguindo o mesmo método descrito para as amostras de manga no item 3.2.2 (Equação I).

3.3.2.1 – Extração Assistida por Homogeneizador em soluções etanólicas ácidas (EAH-HCl)

O sistema de cromatografia líquida utilizado foi o HPLC da Shimadzu, acoplado a um detector UV de arranjo de fotodiodos (DAD). A separação foi feita utilizando a fase estacionária Nucleodur C8 ($3 \mu\text{m}$; $2 \times 125 \text{ mm}$), com um volume de injeção de $2 \mu\text{L}$, temperatura da coluna de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e comprimento de onda de detecção de 280 nm (vanilina) e 370 nm (quercetina). O gradiente de eluição foi realizado com um fluxo de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, com início em 10% de metanol em água (0,1% de ácido fórmico), evoluindo da seguinte forma: 0 min, 10%; 5 min, 20%; 12 min, 35%; 32 min, 56%; 35 min, 100%.

Para o cálculo das curvas analíticas, uma solução-estoque de 20 mg L^{-1} de vanilina e quercetina foi realizada pesando os respectivos padrões analíticos e diluindo-os em solução de etanol, água e ácido clorídrico (HCl) de forma a formar uma solução aquosa de 1 mol L^{-1} do ácido e 70%, em volume, de etanol. Esta solução-estoque foi diluída de forma a obter soluções de 10, 5, 1, 0,5 e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, sendo assim uma curva analítica sem a presença da matriz. Foram realizados os cálculos da regressão linear da curva analítica, bem como os fatores de linearidade e limites de detecção e quantificação, de acordo com os métodos descritos no item 3.2.2.1.

3.3.2.2 – Extração Assistida por Ultrassom em soluções ácidas (EAU-HCl) e demais análises

Para as análises dos extratos obtidos com a técnica de ultrassom (EAU-HCl) e demais ensaios, foi utilizado o equipamento de UHPLC da Waters, com detecção do espectro UV-Vis utilizado o detector de arranjo de diodos (DAD). A fase estacionária utilizada foi a Acquity BEH C8, (1,7 μm ; 2,1 x 50 mm), com temperatura de 35 °C. O volume de injeção foi de 2 μL , em um gradiente de eluição que se inicia em 20% de metanol em água (0,1% de ácido fórmico), seguindo o gradiente da seguinte maneira: 0 min, 20%; 2 min, 20%; 17 min, 42%; 18 min, 100%. As áreas das bandas da vanilina foram aferidas a partir do cromatograma selecionado no comprimento de onda de 280 nm, enquanto para a quercetina o comprimento de onda foi de 370 nm.

Soluções-estoque de 100 mg L⁻¹ de quercetina e vanilina foram preparadas ao pesar os padrões analíticos dos compostos e solubiliza-los em uma solução aquosa de etanol 70% (v/v) e 1 mol L⁻¹ de HCl. Para a curva analítica, esta solução-estoque foi diluída no mesmo solvente para se obter soluções de concentração de 20, 15, 10, 5, 4 e 2,5 mg L⁻¹. Novamente foi realizada apenas a curva analítica sem a presença da matriz. Assim como na seção anterior, os cálculos da regressão linear, os parâmetros de linearidade e limites de detecção e quantificação foram realizados da mesma forma descrita no item 3.2.2.1.

3.3.3 – Metodologias de extração e planejamentos fatoriais

3.3.3.1 – Extração Assistida por Homogeneizador em soluções etanólicas ácidas (EAH-HCl)

As extrações assistidas por homogeneizador se deram, assim como descrito no item 3.2.3.1, utilizando o equipamento homogeneizador de alta velocidade de rotação (IKA T25 basic). Para determinação dos melhores parâmetros de tempo e concentração ácida para extração de vanilina e quercetina, um planejamento fatorial do tipo composto central de face centrada foi realizado. Os níveis selecionados para as duas variáveis que foram utilizados no planejamento fatorial estão listados na Tabela 3.10.

TABELA 3.10 – Variáveis estudadas para a otimização da extração por EAH-HCl com meio ácido para resíduo de goiaba.

Símbolo	Variáveis reais	Variáveis codificadas		
		Min (-1)	PC (0)	Max (+1)
X_1	Concentração de HCl (mol L ⁻¹)	0,01	0,50	1,00
X_2	Tempo (min)	30	105	180

PC=Ponto Central

Para realização das extrações, 1 g da amostra RPG/LO foi pesada e adicionada a um tubo *Falcon* de 50 mL, onde foram adicionados 10 mL da solução aquosa de etanol 70% (v/v) e X_1 mol L⁻¹ de HCl. Desta forma, a razão amostra-solvente foi fixada em 0,1 g mL⁻¹, bem como a concentração de etanol na solução (70% v/v). A mistura sólido-líquido foi levada à extração por homogeneizador, mantida em constante rotação de 11,000 rpm pelo tempo de X_2 min. Após o fim da extração, os extratos foram levados à centrifugação (Hettich Rotanta 460) em temperatura ambiente por 10 minutos. O sobrenadante foi então coletado e filtrado em filtro de seringa PTFE de 0,45 µm (Chromafil), seguindo para injeção no sistema de cromatografia líquida (HPLC). Os experimentos que consistem o planejamento fatorial de composto central, selecionado para a otimização desta extração, podem ser vistos na Tabela 3.11. Eles foram realizados de acordo com a metodologia descrita e em ordem aleatória.

TABELA 3.11 – Planejamento fatorial de face centrada para a otimização da extração de quercetina e vanilina utilizado EAH-HCl a partir de resíduos de processamento de goiaba.

Exp.	Concentração de HCl (X_1)		Tempo (X_2)	
	(mol L ⁻¹)		min	
	Cod.	Real	Cod.	Real
1	0	0,50	0	105
2	0	0,50	0	105
3	0	0,50	0	105
4	1	1,00	1	180
5	1	1,00	-1	30
6	-1	0,01	1	180
7	-1	0,01	-1	30
8	-1	0,01	0	105
9	1	1,00	0	105
10	0	0,50	1	180
11	0	0,50	-1	30

3.3.3.2 – Extração Assistida por Ultrassom em soluções etanólicas ácidas (EAU-HCl)

Seguindo o estudo de viabilidade de extrações de resíduos de processamento de goiaba com a utilização de ácidos, a partir da detecção e quantificação de quercetina e vanilina, foram realizados diferentes ensaios utilizando a técnica de extração assistida por ultrassom (EAU).

a) Estudo temporal com HCl e ácido orgânicos verdes

Por se tratar de uma extração que inclui reações de hidrólise ácida das ligações entre as moléculas fenólicas e suas cadeias de açúcar, foi realizado um ensaio da evolução da concentração dos analitos de acordo com o tempo de extração em uma solução fixa 70% de etanol em água (v/v), com e sem a presença de HCl (1 mol L^{-1}). 0,4 g da amostra RPG/LO foram pesadas e adicionadas à um tubo do tipo *Falcon* de 15 mL, onde 2 mL do solvente foram adicionados. Os tubos foram levados à um banho de ultrassom (Elma), que opera na frequência de 37 kHz, em aquecimento na temperatura de $65 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$), que foi monitorada com um termômetro de mercúrio. Foram realizados experimentos, em triplicata, com tempos de extração de 10, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,2 g de bicarbonato de sódio (Na_2HCO_3) para neutralização da solução, que foi agitada diversas vezes até as bolhas geradas pela reação de neutralização cessarem. O pH da solução foi aferido por tiras de pH para assegurar neutralidade. Os extratos foram levados à centrifugação (Hettich Mikro 185) a 10,000 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e filtrados em filtro de seringa de membrana PTFE de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (Analítica) e seguiram para injeção no UHPLC.

Com o objetivo de comparar e avaliar a melhor seleção do ácido utilizado para a metodologia de extração ácida desenvolvida, três ácido orgânicos considerados “verdes”, de acordo com métrica desenvolvida pela GSK¹⁸¹, foram selecionados: ácido cítrico, ácido acético e ácido ascórbico. Para efeito de comparação, foi utilizada a mesma metodologia descrita acima, porém apenas com o tempo de extração de 90 minutos. Os experimentos foram feitos em triplicata, utilizando como base o mesmo solvente etanólico (70% v/v em água), em concentrações de 1 mol L^{-1} para os ácidos acético e cítrico e $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para o ácido ascórbico. O motivo das diferentes concentrações é a solubilidade limitada do ácido

ascórbico em etanol 70%, não permitindo o preparo de uma solução 1 mol L⁻¹. Os testes foram feitos em triplicata.

b) Otimização da EAU-HCl com planejamento fatorial

Para otimizar os parâmetros que circundam o método de extração por ultrassom com soluções etanólicas na presença de HCl, foi preparado um planejamento fatorial do tipo *Box-Behnken*, cujas variáveis e seus níveis estão apresentados na Tabela 3.12.

TABELA 3.12 – Variáveis estudadas para a extração de resíduos de processamento de goiaba por EAU-HCl.

Símbolo	Variáveis reais	Variáveis codificadas		
		Min (-1)	PC (0)	Max (+1)
X₁	% Etanol/Água (%v/v)	60	70	80
X₂	Amostra-Solvente (g mL ⁻¹)	0,10	0,20	0,30
X₃	Tempo (min)	60	90	120
X₄	Concentração de HCl (mol L ⁻¹)	0,50	1,25	2,00

PC=Ponto Central

As extrações se deram primeiramente pela pesagem da amostra RPG/LC, cuja massa variou de acordo com o parâmetro **X₂**, mantendo fixo o volume do solvente selecionado em 2 mL, cuja concentração de etanol e de HCl se deu de acordo com as variáveis **X₁** e **X₄**. As extrações foram realizadas em tubos *Falcon* de 15 mL, que foram levados ao banho ultrassônico, também mantido em 65 °C, e permaneceram pelo tempo ditado pela variável **X₃**. Após o tempo de extração, os extratos foram neutralizados, centrifugados (Hettich Mikro 185), filtrados (PTFE 0,45 µm, Analítica) e levados para injeção no equipamento de UHPLC, da mesma forma descrita no item a). Os experimentos do planejamento fatorial de *Box-Behnken*, bem como as variáveis que o compõem, codificadas e reais, podem ser visualizados na Tabela 3.13. Estes foram ordenados de forma aleatória para realização dos ensaios, que seguiram de acordo com a metodologia descrita.

TABELA 3.13 – Planejamento fatorial *Box-Behnken* para a extração de quercetina e vanilina de resíduos de processamento de goiaba utilizando EAU-HCl.

Exp.	Etanol/Água (X ₁)		Amostra-Solvente (X ₂)		Tempo (X ₃)		Conc. HCl (X ₄)	
	% v/v		g mL ⁻¹		min		mol L ⁻¹	
	Cod.	Real	Cod.	Real	Cod.	Real	Cod.	Real
1	-1	60	-1	0,10	0	90	0	1,25
2	1	80	-1	0,10	0	90	0	1,25
3	-1	60	1	0,30	0	90	0	1,25
4	1	80	1	0,30	0	90	0	1,25
5	-1	60	0	0,20	-1	60	0	1,25
6	1	80	0	0,20	-1	60	0	1,25
7	-1	60	0	0,20	1	120	0	1,25
8	1	80	0	0,20	1	120	0	1,25
9	-1	60	0	0,20	0	90	-1	0,50
10	1	80	0	0,20	0	90	-1	0,50
11	-1	60	0	0,20	0	90	1	2,00
12	1	80	0	0,20	0	90	1	2,00
13	0	70	-1	0,10	-1	60	0	1,25
14	0	70	1	0,30	-1	60	0	1,25
15	0	70	-1	0,10	1	120	0	1,25
16	0	70	1	0,30	1	120	0	1,25
17	0	70	0	0,20	-1	60	-1	0,50
18	0	70	0	0,20	1	120	-1	0,50
19	0	70	0	0,20	-1	60	1	2,00
20	0	70	0	0,20	1	120	1	2,00
21	0	70	-1	0,10	0	90	-1	0,50
22	0	70	1	0,30	0	90	-1	0,50
23	0	70	-1	0,10	0	90	1	2,00
24	0	70	1	0,30	0	90	1	2,00
25	0	70	0	0,20	0	90	0	1,25
26	0	70	0	0,20	0	90	0	1,25
27	0	70	0	0,20	0	90	0	1,25

3.3.4 – Comparação entre diferentes métodos de secagem

Assim como descrito na seção sobre os métodos de obtenção e condicionamento das amostras de resíduo de processamento de goiaba, a amostra RPG/LC passou por duas metodologias de secagem diferentes para efeitos de comparação da eficiência de extração de quercetina e vanilina. Para isso, foram feitas extrações em triplicata para cada amostra utilizando a extração assistida por ultrassom em solução ácida de HCl (EAU-HCl). As amostras de resíduo de goiaba obtidas a partir da secagem em estufa de circulação de ar (RPG/LC-E) e por liofilização (RPG/LC-L) foram pesadas (0,4 g) e transferidas para um tubo *Falcon* de 15 mL, onde foram adicionados 2 mL de uma solução de 70% (v/v) de etanol em água

e 1 mol L⁻¹ de HCl. O tempo de extração em banho de ultrassom foi de 90 minutos, seguindo a mesma metodologia já descrita no item 3.3.3.2 (EAU-HCl) até a injeção no sistema de cromatografia líquida. As médias de eficiência de extração obtidas a partir das triplicatas foram comparadas para avaliar as diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para avaliação do perfil químico das amostras obtidas a partir de diferentes métodos de secagem, foram realizadas corridas cromatográficas exploratórias com o objetivo de obter cromatogramas que contemplem todo o gradiente de eluição. Estas leituras foram feitas no UHPLC da Waters, com detecção do espectro UV-Vis utilizado o detector de arranjo de diodos (DAD). A fase estacionária utilizada foi a Acquity BEH C8, (1,7 μm ; 2,1 x 50 mm), com temperatura de 35 °C e volume de injeção de 2 μL . O gradiente de eluição foi realizado com água acidificada com ácido fórmico (0,1%) e metanol, e evoluiu da seguinte forma: 0 min, 10% de metanol; 2 min, 10%; 17 min, 100%; 20 min, 100%.

3.3.5 – Comparação entre diferentes amostras

Assim como para a manga, também foram avaliadas as presenças de quercetina e vanilina nas diferentes amostras obtidas de resíduo de goiaba (RPG/LO e RPG/LC), ambas obtidas a partir de secagem em liofilizador. Os mesmos parâmetros utilizados para a comparação entre diferentes métodos de secagem foram utilizados, em triplicata, com a técnica de extração por ultrassom (EAU-HCl). O teste de Tukey ($p < 0,05$) foi utilizado para avaliação das diferenças significativas entre as médias. Também foram realizadas corridas cromatográficas exploratórias, já descritas no item anterior.

3.4 – Laranja (*Citrus sinensis*)

3.4.1 – Obtenção e condicionamento das amostras

Frutas de laranja (*Citrus sinensis*) derivadas de produção do tipo agroflorestal foram obtidas a partir de produtores parceiros (Santa Cruz do Rio Pardo, SP). Estas foram lavadas em água corrente e enxaguadas com água destilada. Após secas, as frutas foram descascadas com uma faca de aço inox, obtendo apenas a

casca, definida aqui como parte do resíduo de processamento da laranja. As cascas foram secas em estufa de circulação de ar (Tecnal), moídas em liquidificador industrial (Fiochi), peneiradas em peneira de inox de 18 mesh (1 mm) de abertura e finalmente acondicionadas em recipiente de vidro, protegido da luz, umidade e calor.

3.4.2 – Método cromatográfico e curva analítica

Os métodos cromatográficos desenvolvidos para a detecção e quantificação de hesperidina em amostras de casca de laranja foram desenvolvidos em equipamento de UHPLC da Waters, com detecção em detector de arranjo de diodos (DAD). A fase estacionária utilizada foi a Acquity CSH C8 (1.7 μm , 2.1 x 100 mm), com uma injeção de 1 μL das amostras e utilizando água ultrapura e metanol como solventes para o gradiente de eluição.

Para o método de determinação de hesperidina, a coluna foi aquecida a 35 °C e foi condicionada em 10% de metanol em água, com o gradiente de eluição evoluindo da seguinte forma: 0 min, 10%; 2 min, 20%; 7 min, 27,5%; 8 min, 100%. A detecção de hesperidina e a integração das áreas de banda correspondentes foram feitas em comprimento de onda de 280 nm. Para a estimativa da concentração, foram realizadas curvas analíticas a partir de uma solução-estoque de 324 mg L⁻¹ de padrão analítico de hesperidina em metanol (TEDIA, grau HPLC), que foi diluída de forma a obter as concentrações de 256, 188, 120, e 52 mg L⁻¹.

Foi realizada a conversão da unidade de concentração dos analitos de mg L⁻¹ para mg g⁻¹, assim como descrito anteriormente na introdução do item 3.2.2, exceto com a mudança para a massa dos analitos por gramas, invés de quilogramas, por conta da maior grandeza de eficiência de extração obtida nestes ensaios.

3.4.3 – Parâmetros de Hansen e teste de solubilidade

Os HSPs das substâncias estudadas neste ensaio foram determinados tanto da forma teórica como da forma empírica, para efeitos de comparação e validação do método teórico. Além disso, no método empírico é possível determinar o raio da esfera de solubilidade de Hansen (R_0), parâmetro que não pode ser determinado de forma teórica.

Utilizando a ferramenta DIY do *software* HSPiP (versão 5.0.03), foi possível obter os valores teóricos de δ_D , δ_P e δ_H da hesperidina ao inserir seu descritor SMILES. Já para a determinação empírica dos HSPs, foi realizado um teste de solubilidade ao adicionar 1 mL dos solventes a 1 mg do padrão analítico de hesperidina, seguido de agitação. O cálculo dos HSPs é feito a partir de pontuações de 1 a 5 dadas a cada solvente, baseadas na capacidade do mesmo de solubilizar a substância estudada. A pontuação foi dada de forma qualitativa, ou seja, por análise visual da mistura solvente e soluto (Figura 3.7). Os solventes receberam a pontuação de 1 ou 2 se obtiveram uma solução límpida e transparente; as pontuações 3 ou 4 foram dadas a misturas levemente turvas, com aparente presença de sólidos em suspensão; a pontuação 5 foi dada às misturas turvas e com presença de sólidos no fundo do frasco.



FIGURA 3.7 – Ensaio de solubilidade para determinação empírica dos parâmetros de Hansen. Os frascos representam exemplos da análise qualitativa de solubilidade da hesperidina e suas pontuações.

A diferenciação das notas enquadradas nas mesmas categorias (1/2 e 3/4) foi dada por comparação visual entre os frascos. Todos os solventes utilizados para este teste podem ser vistos na Tabela 3.14, classificados de acordo com a sua polaridade e periculosidade, obtidos a partir do guia de solventes verdes *Chem21*⁶³.

TABELA 3.14 – Solventes utilizados para testes de solubilidade de hesperidina, suas polaridades e classificações de acordo com o guia de solventes verdes *Chem21*.

Polaridade dos solventes			
Polar prótico	Polar aprótico	Apolar	
1-Butanol (BuOH)	Etil acetato	Ciclohexano	
Etanol (EtOH)	Metil Etil Cetona (MEK)	Heptano	
Metanol (MeOH)	<i>Cyrene</i> (Dihidroleovoglucosenona)	d-Limoneno	
2-Propanol	Acetonitrila (MeCN)	Tolueno	
Água (H ₂ O)	Dimetil sulfóxido (DMSO)	α-Pineno	
Ácido acético	Diclorometano (DCM)	Hexano	
Anidrido acético	Tetrahidrofurano (THF)	1,4-Dioxano	
Etileno Glicol (EG)	Acetona	Tetracloro de carbono	
Ácido Fórmico	Dimetilacetamida (DMAc)	Clorofórmio	
	Dimetilformamida (DMF)	Dietil Éter	
		Benzeno	
Recomendado	Problemático	Perigoso	Altamente perigoso

Ao inserir os valores das pontuações de solubilidade de cada solvente para a substância estudada no *software* HSPiP, o programa calcula, através de diversas iterações, os valores de δ_D , δ_P , δ_H e R_0 de hesperidina que melhor se aproximam das pontuações dadas. Isto é, o programa encontra os melhores parâmetros possíveis que façam com que os solventes com melhor pontuação estejam dentro da esfera de solubilidade, e os solventes com pior pontuação estejam fora. Os valores dos parâmetros de Hansen dos solventes são pré-determinados pela própria biblioteca encontrada no programa, exceto os do solvente *Cyrene* (Dihidroleovoglucosenona), que foram calculados utilizando a ferramenta DIY a partir de sua estrutura molecular.

Baseado na esfera de Hansen, foi possível determinar o parâmetro de diferença de energia relativa (**RED**, na sigla em inglês), que auxilia na determinação da habilidade de um solvente solubilizar um soluto a partir da distância R_a entre o ponto do solvente e do soluto no espaço de Hansen (Equação V). Como pode ser visto na Equação VI, um **RED**<1 sugere uma alta afinidade soluto solvente (solvente dentro da esfera de Hansen do soluto), enquanto **RED**>1 demonstra uma baixa afinidade (fora da esfera) e **RED**=1 sugere uma situação limítrofe entre as duas condições (superfície da esfera). Desta forma, a partir de uma aproximação teórica baseada nos parâmetros obtidos de forma empírica, é possível estimar que quanto menor o valor de **RED**, maior é a solubilidade do solvente para este soluto.

Equação V ↓

$$R_a = \sqrt{4(\delta_{D,\text{solvente}} - \delta_{D,\text{soluto}})^2 + (\delta_{P,\text{solvente}} - \delta_{P,\text{soluto}})^2 + (\delta_{H,\text{solvente}} - \delta_{H,\text{soluto}})^2}$$

$$\text{Equação VI} \quad RED = R_a / R_0$$

O cálculo do **RED** permite, portanto, encontrar solventes e misturas de solventes, no plano teórico, que otimizem a solubilidade dos solutos estudados a partir da minimização deste parâmetro. Para isso, foram utilizados os parâmetros de Hansen (δ_D , δ_P , δ_H) encontrados na biblioteca do *software* para solventes puros. Os parâmetros das misturas binárias e ternárias são obtidos a partir da média ponderada dos solventes que as compõem, multiplicando os valores individuais dos parâmetros de cada solvente por sua fração volumétrica na mistura (Equação VII). Para misturas binárias, o último componente da equação é nulo (apenas solventes *i* e *j*).

Equação VII ↓

$$\delta_x = (\delta_{x,\text{solvente } i} \times \varphi_{\text{solvente } i}) + (\delta_{x,\text{solvente } j} \times \varphi_{\text{solvente } j}) + (\delta_{x,\text{solvente } k} \times \varphi_{\text{solvente } k})$$

sendo:

δ_x = cada um dos parâmetros de Hansen da mistura;

$\delta_{x,\text{solvente } i,j,k}$ = o parâmetro de Hansen equivalente do solvente puro que compõe a mistura;

$\varphi_{\text{solvente } i,j,k}$ = a fração volumétrica do solvente na mistura.

Dotado da Equação V, Equação VI e Equação VII e os dados dos parâmetros de Hansen dos solventes puros, é possível obter os valores de fração volumétrica φ que minimizem o valor de **RED** de misturas binárias e ternárias de solventes para hesperidina. Para isso, o *software* Microsoft Office Excel, munido da ferramenta *Solver*, foi utilizado de forma a obter as frações volumétricas que possam minimizar os valores de **RED**. O *Solver* (método *Evolutionary*) se utiliza de uma

metodologia de cálculo através da qual realiza diversas iterações entre as células variáveis (ϕ), de acordo com as restrições configuradas (neste caso, $0 \leq \phi \leq 1$), até encontrar as variáveis que minimizem o valor da célula-objetivo (**RED**).

3.4.4 – Ensaios de extrações de solventes puros e misturas

Para a avaliação da extração de hesperidina, foram pesadas 250 mg da amostra de cascas de laranja e adicionadas a 5 mL do solvente, seguido por homogeneização tal como já descrito para as Extrações Assistidas por Homogeneizador (EAH). O equipamento IKA T10 basic foi utilizado por 2 minutos a 14,450 rpm. Diferentes tipos de extração foram realizados. No primeiro tipo, em Temperatura Ambiente (EAH-TA), a extração foi realizada sem aquecimento e com os solventes e misturas encontrados com menor valor de RED a partir do cálculo explicitado no item anterior. Para uma melhor investigação da capacidade de extração do solvente *Cyrene* em maiores temperaturas, também foi feito um teste de extração a Quente (EAH-Q), onde a mistura sólido-líquido foi levada ao aquecimento a 65 °C por 2 horas, e então passou pelo mesmo procedimento descrito para a EAH-TA. Os extratos foram centrifugados a 10,000 rpm a 10°C por 10 minutos, o sobrenadante coletado e filtrado em filtros de seringa de PTFE de 0,45 μ m (Analítica), seguido por análise em UHPLC.

3.5 – Análises quimiométricas

O uso de planejamentos fatoriais, escolhidos de acordo com as características próprias de cada método de extração e seus parâmetros selecionados, permite a avaliação multivariada da influência destes parâmetros na eficiência de extração dos compostos selecionados como marcadores de referência dos extratos bioativos. A partir destes planejamentos e os resultados obtidos para cada experimento, é possível realizar análises estatísticas para avaliar como cada parâmetro pode influenciar na eficiência de extração, e desta forma obter os valores destes parâmetros que otimizam as respostas dentro dos níveis selecionados. Neste item serão apresentadas as metodologias utilizadas nestas análises. Todos os cálculos descritos neste item foram realizados em Microsoft Office Excel (Professional

Plus 2019), com exceção dos modelos polinomiais, que foram realizados no software livre GNU Octave (versão 4.2.1)¹⁸².

3.5.1 – Codificação das variáveis

Para que os planejamentos fatoriais possibilitem o cálculo dos efeitos dos parâmetros e posterior cálculo dos modelos polinomiais e superfícies de resposta, é necessário que as variáveis sejam codificadas (ou normalizadas). Para efeito de todos os planejamentos descritos nesta tese, os níveis máximos ($X_{máx}$) selecionados foram codificados como +1 e os níveis mínimos ($X_{mín}$) como -1. Para codificação (transformação de variáveis em valores reais para codificados) e decodificação (transformação de valores codificados para valores reais), dois fatores devem ser calculados, aqui chamados de **a** e **b** (Equação VIII e Equação IX). Com estes fatores é possível fazer o cálculo das variáveis codificadas (x_i^*) e das variáveis reais (x_i), de acordo com a Equação X e Equação XI.

$$\text{Equação VIII} \quad a = \frac{X_{máx} + X_{mín}}{2}$$

$$\text{Equação IX} \quad b = \frac{X_{máx} - X_{mín}}{2}$$

$$\text{Equação X} \quad x_i^* = \frac{x_i - a}{b}$$

$$\text{Equação XI} \quad x_i = (x_i^* \cdot b) + a$$

3.5.2 – Estimativa dos efeitos das variáveis

A estimativa dos efeitos de cada variável e suas interações é calculada a partir da diferença entre as respostas de cada variável em níveis máximos e mínimos. Para isso, em cada variável ou interação entre variáveis (x_i), são feitas as médias de todas as respostas obtidas em níveis máximos desta variável ($y_m^{máx}$) e de nível mínimo ($y_m^{mín}$), sendo **m** o número do experimento. A diferença entre elas é a estimativa do efeito (E_{x_i}), como pode ser visto na Equação XII. Para interações entre variáveis, os níveis máximos e mínimos são determinados pela multiplicação entre os

valores codificados de cada variável para cada experimento. Desta forma, para o cálculo do efeito da interação entre as variáveis x_1 e x_2 , por exemplo, em cada experimento é calculada a variável codificada x_{12} , que é resultante do produto entre as variáveis codificadas x_1 e x_2 . Os valores de efeito também são estimados em porcentagem ($E_{x_i}^{\%}$), obtidos a partir do quadrado dos valores de efeito em relação à soma dos quadrados de todas as variáveis e suas interações (Equação XIII).

$$\text{Equação XII} \quad E_{x_i} = \frac{\sum_{m=1}^{n^{máx}} y_m^{máx}}{n^{máx}} - \frac{\sum_{m=1}^{n^{mín}} y_m^{mín}}{n^{mín}}$$

$$\text{Equação XIII} \quad E_{x_i}^{\%} = \frac{E_{x_i}^2}{\sum E_{x_i}^2} 100$$

Os valores encontrados de efeito em termos de valores brutos e de porcentagem foram plotados em gráficos de barras para comparação, que serão incluídos no Apêndice 1 para consulta.

3.5.3 – Função desejabilidade

Para quando a otimização das variáveis das diferentes técnicas de extração resultou em parâmetros significativamente diferentes entre as respostas, uma função de desejabilidade foi calculada com o objetivo de unificar as eficiências de extração em uma única resposta, obtendo parâmetros que otimizem a extração dos compostos simultaneamente. Para isto, a Equação XIV e a Equação XV foram utilizadas. Desta forma, os valores de desejabilidade global (D), situados entre os valores de 0 e 1, demonstram um valor desejável quando próximos do máximo, i.e. quando ambas respostas estão próximas do valor máximo obtido.

$$\text{Equação XIV} \quad d_i = \left(\frac{y_i - L}{T - L} \right)^s$$

$$\text{Equação XV} \quad D = \sqrt[2]{d_1 \times d_2}$$

sendo:

d_i = a função desejabilidade de cada resposta;

y_i = as respostas em cada experimento;

L = o menor valor aceitável (menor resposta obtida);

T = o valor alvo (maior resposta obtida);

s = o peso (no caso, s=1 para função linear)

Os resultados para a função desejabilidade, calculados para cada experimento do planejamento fatorial, podem também ser analisados de acordo com a metodologia de superfície de resposta, permitindo avaliar em quais parâmetros é possível obter uma resposta que otimize simultaneamente a eficiência de extração de todas as respostas obtidas ($D=1$, ou próximo de 1).

3.5.4 – Modelagem e metodologia de superfície de resposta

Para obtenção de uma superfície de resposta que simule o efeito das variáveis nas respostas, e conseqüentemente encontrar pontos de otimização e verificar tendências, é necessário fazer o ajuste dos dados de resposta obtidos em um modelo polinomial de segunda ordem (Equação XVI). Utilizando um software de cálculo matricial (Octave), é possível realizar este ajuste ao utilizar uma rotina pré-programada, obtendo os valores dos coeficientes (β), que permitem a plotagem das superfícies de resposta, bem como as análises de variância (ANOVA) do modelo. As tabelas ANOVA dos modelos polinomiais calculados neste trabalho podem ser encontradas no Apêndice 2 para consulta.

$$\text{Equação XVI} \quad y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j^* + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^{*2} + \sum \sum_{i < j=2}^k \beta_{ij} x_i^* x_j^*$$

sendo:

y = a resposta;

β = os coeficientes do modelo polinomial;

x^* = as variáveis codificadas;

A partir dos coeficientes obtidos, também é possível fazer a determinação do ponto ótimo de cada extração de acordo com a faixa de níveis selecionados para cada variável. Para isso, o add-on *Solver*, do Excel, foi utilizado no modo *Evolutionary*, selecionando a resposta y como célula-alvo para maximização e as variáveis x^* como células-variáveis. As restrições foram determinadas para não permitir iterações com valores de x^* maiores do que 1 ou menores do que -1 para todas as variáveis.

3.6 – Ensaios biológicos

3.6.1 – Atividade algicida (*R. subcapitata*)

Os ensaios de atividade algicida foram realizados em parceria com pesquisadores da Universidade de Leuphana, Alemanha, em período de estágio doutoral no exterior. Extratos de provenientes de resíduos de processamento de manga e soluções de padrões analíticos dos marcadores de referência mangiferina e hiperosídeo foram testados de acordo com a inibição de crescimento de algas *Raphidocelis subcapitata* (também previamente conhecidas como *Pseudokirchneriella subcapitata*). Os testes foram realizados de acordo com o guia 201 da OECD, seguindo seus critérios de validação¹⁸³. As algas da espécie *R. subcapitata* foram selecionadas como organismo teste e cultivadas em meio de cultura OECD, de acordo com composição listada na Tabela 3.15.

TABELA 3.15 – Composição do meio de cultura OECD.

Substância	Concentração (g L⁻¹)
NH ₄ Cl	1,5
MgCl ₂ * 6H ₂ O	1,2
CaCl ₂ * 2H ₂ O	1,8
MgSO ₄ * 7H ₂ O	1,5
KH ₂ PO ₄	0,16
FeCl ₃ * 6H ₂ O	0,064
NaEDTA * 2H ₂ O	0,1
H ₃ BO ₃ ^a	0,185
MnCl * 4H ₂ O	0,415
ZnCl ₂	0,003
CoCl ₂ * 6H ₂ O	0,0015
CuCl ₂ * 2H ₂ O	0,00001
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0,007
NaHCO ₃	50,0

O ensaio foi realizado em placas de cultura de 24 poços (Greiner Bio-One), com densidade celular inicial de 10.000 células mL⁻¹ e volume total de 2 mL. As soluções-estoque (em DMSO) e os extratos foram adicionados a cada poço da placa de forma a obter de 6 a 9 diferentes concentrações para cada ensaio, então completadas com o solvente da solução testada de forma a obter a mesma quantidade de solvente em cada poço. Os testes brancos (apenas solvente) e controle (cultura da alga e solvente) foram tratados da mesma forma que as soluções testadas e todos os tratamentos foram feitos em duplicata em cada placa e repetidos uma vez, resultando no total de 4 repetições para cada tratamento.

Os extratos utilizados foram os mesmos relatados no item 3.2.3.4 (EAH-LIs), utilizando extração assistida por homogeneizador, a 16,000 rpm, por 10 minutos e 0,1 g mL⁻¹ de razão amostra-solvente. Estes foram analisados e quantificados quanto à mangiferina (58,5 mg L⁻¹) e hiperosídeo (75,2 mg L⁻¹), bem como relatado nas sessões anteriores relativas à metodologia EAH-LIs (ver Caps. 3.2.2.3 e 3.2.3.4). As soluções-estoque foram preparadas a partir dos padrões analíticos, diluídos em DMSO. Os extratos foram esterilizados por filtração em filtro de seringa com membrana (Machery-Nagel). Os pratos foram incubados por 72 horas a 23 ± 2 °C sob iluminação constante de 100 µE m² s⁻¹ e agitação de 160 rpm com o auxílio de um *shaker*. A cada intervalo de 24 horas, até 72 horas, a densidade celular foi quantificada a partir da fluorescência da clorofila a, presente nas algas, através de curva analítica

realizada com diferentes concentrações do meio celular das algas (intervalo de 5.000 a 100.000 células mL⁻¹). Foi utilizado o equipamento de leitura de fluorescência em placas de cultura (Synergy HT), com excitação no comprimento de onda de 450 nm e detecção da emissão de fluorescência em 680 nm. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados para esta curva analítica utilizando o software DINTEST 2000. Antes da leitura da fluorescência, as placas foram tampadas, seladas com *parafilm* e agitadas para obter homogeneidade da suspensão de células de alga.

A inibição de crescimento das algas foi calculada de acordo com a Equação XVII e a Equação XVIII, onde: μ é a taxa de crescimento, calculada para o controle (μ_{controle}) e para a amostra (μ_{amostra}); DC é a densidade celular (inicial, DC₀ e após 72 horas, DC₇₂); Δt é a diferença de tempo (72 horas); e %I $_{\mu}$ é a inibição de crescimento das algas.

$$\text{Equação XVII} \quad \mu = \frac{\ln DC_{72} - \ln DC_0}{\Delta t}$$

$$\text{Equação XVIII} \quad \%I_{\mu} = \frac{\mu_{\text{controle}} - \mu_{\text{amostra}}}{\mu_{\text{controle}}} 100$$

Para determinação do EC₅₀ (concentração da substância que induz 50% da resposta máxima de inibição), foram plotadas curvas de %I $_{\mu}$ versus concentração, onde os valores de EC₅₀ de cada substância ou extrato testados podem ser calculados a partir da regressão linear destas curvas para cada tratamento. Cada repetição foi plotada individualmente e, então, o valor de EC₅₀ foi calculado a partir da média de cada curva individual.

3.6.2 – Atividade inseticida

3.6.2.1 – Lagarta (*H. armigera*)

- a) Avaliação da mortalidade das lagartas de *H. armigera* em extratos de resíduos de manga e goiaba

O ensaio de atividade inseticida contra a lagarta *Helicoverpa armigera* foi realizado seguindo um delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 30 repetições (Tabela 3.16), sendo cada repetição composta por 1 lagarta de 2°

instar, totalizando 150 experimentos. O ensaio foi realizado em sala climatizada com temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa do ar de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. Para este teste de atividade, o extrato etanólico proveniente de resíduos de processamento de manga (RPM/LC) foi obtido a partir do método previamente descrito EAH-EtOH, utilizando $0,5 \text{ g mL}^{-1}$ de razão amostra-solvente, 5 minutos de extração e 70% de etanol em água. Já para o extrato etanólico de goiaba (RPG/LC), foi utilizada a metodologia por EAU-HCl com os seguintes parâmetros: $0,5 \text{ g mL}^{-1}$ (amostra-solvente); solvente de 70% etanol em água e $1,25 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl; e 60 minutos de extração. Os extratos foram então diluídos em água ultrapura numa proporção de 2:1 (extrato:água). As concentrações finais quantificadas nos extratos diluídos foram de $61,2 \text{ mg L}^{-1}$ de mangiferina e $92,2 \text{ mg L}^{-1}$ de hiperosídeo (soma $153,4 \pm 4,8 \text{ mg L}^{-1}$) no extrato de RPM e $11,4 \text{ mg L}^{-1}$ de quercetina e $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de vanilina (soma $15,4 \pm 0,8 \text{ mg L}^{-1}$) nos extratos de RPG. Os solventes, utilizados como controle negativo, foram diluídos da mesma forma que os extratos, sendo o solvente RPG também sujeito ao mesmo processo de neutralização com bicarbonato de sódio presente no método EAU-HCl.

TABELA 3.16 – Tratamentos utilizados para determinação de mortalidade de insetos de lagarta de *H. armigera*

Produto	Marcadores de referência ou ingredientes ativos	Dose (%)	Concentração (mg L⁻¹)
Extrato RPM	mangiferina, hiperosídeo	100,00	153,4 ^a
Extrato RPG	vanilina, quercetina	100,00	15,4 ^a
Solvente RPM	-	-	-
Solvente RPG	-	-	-
Controle positivo	Flubendiamida (Belt®)	-	480 mg L ⁻¹

^aSoma das concentrações dos marcadores de referência

Lagartas de 2º instar de *H. armigera* foram expostas aos tratamentos por ingestão, a partir da alimentação de dieta artificial, à base de feijão (Greene et al., 1976)¹⁸⁴, tratada com as respectivas soluções testadas. O ensaio, conhecido como *diet-overlay*, foi conduzido em copos plásticos de 50 mL. À cada copo, foi adicionado um volume de 2 mL de dieta artificial e 0,2 mL de solução inseticida sobre a superfície da dieta (Figura 3.8).

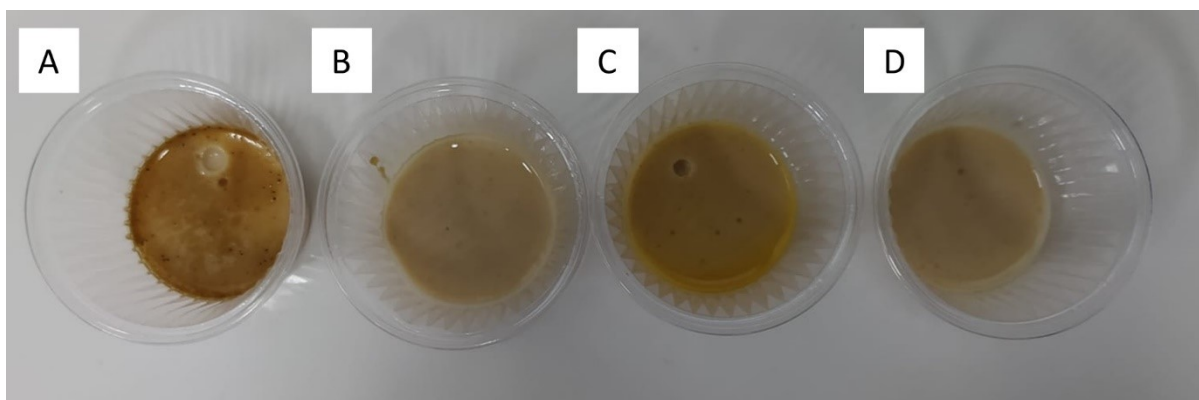


FIGURA 3.8– Unidade experimental do ensaio de atividade inseticida com *H. armigera*, constando de um copo plástico de 50 mL, com uma lagarta de 2° instar de *H. armigera* e 2 mL de dieta artificial coberta por 0,2 mL de solução inseticida: A. Extrato RPM; B. Solvente RPM; C. Extrato RPG; D. Solvente RPG.

Aos extratos e solventes, foi feita a adição do surfactante Triton X-100 (Vetec) na proporção de 0,1%_{v/v} das soluções. O tratamento controle positivo com o produto Belt® (Bayer), cujo composto ativo é a flubendiamida, foi diluído em água destilada de acordo com as instruções do fabricante (1000x) e a esta solução foi adicionado o mesmo surfactante dos outros tratamentos (0,1%_{v/v}). Ao final, 0,2 mL de solução inseticida foi depositado sobre a dieta artificial em cada copo, onde foi adicionada uma lagarta após a secagem da solução depositada. A mortalidade dos insetos foi, então, avaliada diariamente, desde o 1° dia após o início do ensaio, até o 10° dia.

b) Avaliação da inibição de crescimento das lagartas de *H. armigera* em extratos de resíduo de manga

A redução no desenvolvimento das lagartas de *H. armigera* foi avaliada de acordo com método semelhante ao descrito no item anterior, apenas utilizando o extrato proveniente de resíduo de manga (RPM), em diferentes diluições (Tabela 3.17). Oito diferentes tratamentos foram realizados com 30 repetições cada (uma lagarta de 2° instar por repetição). As condições de clima do ambiente de teste foram exatamente as mesmas do ensaio anterior, assim como o método de aplicação dos tratamentos (2 mL da dieta artificial, 0,2 mL da solução inseticida com 0,1%_{v/v} de surfactante). A mortalidade das lagartas foi avaliada diariamente até 10 dias após o início do ensaio, quando foram analisados também o peso e o diâmetro da cápsula cefálica de 10 indivíduos vivos por tratamento. A inibição do crescimento das lagartas

foi quantificada de acordo com estes dois fatores em relação ao controle negativo (água destilada) utilizando a Equação XVIII (Item 3.6.1).

TABELA 3.17 – Tratamentos utilizados para avaliação da inibição de crescimento de lagartas de *H. armigera*

Produto	Marcadores de referência ou ingredientes ativos	Diluição	Dose (%)	Concentração (mg L ⁻¹)
Extrato RPM	mangiferina, hiperosídeo	-	100,00	153,4 ^a
Extrato RPM	mangiferina, hiperosídeo	2x	50,00	76,7 ^a
Extrato RPM	mangiferina, hiperosídeo	5x	20,00	30,7 ^a
Extrato RPM	mangiferina, hiperosídeo	10x	10,00	15,3 ^a
Extrato RPM	mangiferina, hiperosídeo	20x	5,00	7,7 ^a
Extrato RPM	mangiferina, hiperosídeo	30x	3,33	5,1 ^a
Solvente RPM	-	-	-	-
Água destilada	-	-	-	-

^aSoma das concentrações dos marcadores de referência

3.6.2.2 – Percevejo-marrom (*E. heros*)

Semelhante ao ensaio realizado com as lagartas (item a), os mesmos extratos produzidos foram utilizados para a avaliação da atividade inseticida em termos da mortalidade de ninfas de percevejo-marrom. O ensaio foi realizado seguindo um delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 30 repetições (Tabela 3.18), sendo cada repetição composta por 1 ninfa de 2° instar (n=150). O ensaio foi realizado em sala climatizada com temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa do ar de 70 ± 10% e fotofase de 14 horas.

TABELA 3.18 – Tratamentos utilizados para determinação de mortalidade de insetos de percevejo-marrom (*E. heros*).

Produto	Marcadores de referência ou ingredientes ativos	Dose (%)	Concentração (mg L ⁻¹)
Extrato RPM	mangiferina, hiperosídeo	100,00	153,4 ^a
Extrato RPG	vanilina, quercetina	100,00	23,6 ^a
Solvente RPM	-	100,00	-
Solvente RPG	-	100,00	-
Controle positivo	tiametoxam + lambda-cialotrina (Engeo Pleno S [®])	-	141,0 ^b + 106,0 ^c

^aSoma das concentrações dos marcadores de referência; ^bconcentração aplicada de tiometoxam; ^cconcentração aplicada de lambda-cialotrina

Ninfas de 2^o instar de *E. heros* foram expostas aos diferentes produtos por ingestão, a partir da alimentação de dieta natural à base de feijão-vagem, previamente imersa em soluções com os respectivos tratamentos. Após as seções de feijão-vagem secarem, em cada repetição, 5 ninfas foram confinadas em uma placa de Petri de 8 cm de diâmetro, com um disco de papel filtro, uma seção de 5 cm de vagem e uma seção de algodão umedecido (Figura 3.9). Além da exposição via oral por meio da seção de feijão-vagem, as ninfas foram expostas aos inseticidas via contato com o disco de papel filtro, que foi pulverizado com 0,8 mL de solução inseticida.



FIGURA 3.9– Unidade experimental do ensaio de atividade inseticida com *E. heros*, constando de uma placa de Petri de 8 cm de diâmetro e uma seção de feijão-vagem e um disco de papel filtro impregnados com solução inseticida, com uma ninfa de 2^o instar de *E. heros*: (A) Extrato RPG; (B) Solvente RPG; (C) Extrato RPM; (D) Solvente RPM.

O surfactante Triton X-100 (Vetec) foi adicionado aos extratos e solventes na proporção de 0,1 %v/v das soluções. O tratamento de controle positivo foi realizado com o produto Engeo Pleno S (Syngenta), cujos compostos ativos são o tiometoxam e a lambda-cialotrina, foi diluído em água destilada (1000x) e a esta solução foi adicionado o surfactante, na mesma concentração dos extratos. A

mortalidade dos insetos foi avaliada diariamente desde o 1° dia após a instalação do ensaio até o 10° dia após a instalação do ensaio.

3.6.3 – Atividade fitotóxica (*G. max*)

Este ensaio foi realizado em condições de semicampo (casa-de-vegetação). Para isso, plantas de soja (*Glycine max* L. Merr.) da cultivar “BMX Potência RR” (Brasmax) foram conduzidas em vasos de 3,5 L, contendo mistura de solo:substrato comercial para plantas (HT Hortaliças, Vida Verde) na proporção volumétrica 1:1, adicionados de 7,0 g de adubo NPK 5-20-20 (Heringer). Cada unidade experimental constituiu-se de uma planta em um vaso contendo seis plantas de soja. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (extratos RPM e RPG, solventes e controle; Tabela 3.19) e 30 repetições. Novos extratos de resíduo de manga (RPM) foram preparados para este ensaio, utilizando os mesmos parâmetros de extração descritos para os testes de atividade inseticida (Item 3.6.2.1). A concentração do extrato RPM, em termos da soma dos dois marcadores de referência, foi de $151,0 \pm 0,8 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto para a goiaba a soma foi de $15,4 \pm 0,8 \text{ mg L}^{-1}$, mesmo extrato utilizado nos testes anteriores.

TABELA 3.19 – Tratamentos utilizados para a determinação de atividade fitotóxica dos extratos RPM e RPG contra a planta de soja (*Glycine max*)

Produto	Marcadores de referência ou ingredientes ativos	Dose (%)	Concentração (mg L⁻¹)
Extrato RPM	mangiferina, hiperosídeo	100,00	151,0
Extrato RPG	vanilina, quercetina	100,00	15,4
Solvente RPM	-	100,00	-
Solvente RPG	-	100,00	-
Controle (água)	-	-	-

Para a pulverização dos extratos botânicos e seus solventes utilizaram-se borrifadores manuais individuais (500 mL). As plantas de soja foram pulverizadas com as soluções de cada tratamento até o ponto de escorrimento foliar, ao final da tarde (18:00). A pulverização ocorreu cerca de 20 dias após a sementeira, momento em que as plantas se encontravam no estágio fenológico V₄, isto é, com a terceira folha trifoliolada completamente desenvolvida¹⁸⁵. Após as pulverizações e secagem

das caldas, as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação até o final do experimento (72 horas).

As avaliações foram realizadas aplicando-se notas de 0 a 4, conforme escala de fitotoxicidade adotada por Sarmiento-Brum et al. (2014)¹⁸⁶, em que nota “0” corresponde a ausência de fitotoxicidade nas folhas (0% de fitotoxicidade); nota “1” corresponde de clorose a início de necrose nas folhas (1 a 25% de fitotoxicidade); nota “2” corresponde a necrose em algumas áreas nas folhas (26 a 50% de fitotoxicidade); nota “3” corresponde a acentuada necrose em várias áreas nas folhas (51 a 75% de fitotoxicidade); e nota “4” corresponde a murcha total da planta (76 a 100% de fitotoxicidade). Os dados foram analisados, inicialmente, quanto à normalidade e homocedasticidade de variâncias pelos testes de Shapiro-Wilk e de Bartlett, sendo, posteriormente, submetidos à análise de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis, e Dunn com correção de Bonferroni *post-hoc* ($p \leq 0,05$). Além disso, de maneira descritiva, elaborou-se uma tabela de frequências a fim de demonstrar o percentual de plantas classificadas em cada uma das notas (0 a 4) de fitotoxicidade.

4 – Resultados e discussão

4.1 – Manga (*Mangifera indica*)

4.1.1 – Métodos cromatográficos, curvas analíticas e figuras de mérito

4.1.1.1 – Extração Assistida por Homogeneizador em soluções etanólicas (EAH-EtOH)

Primeiramente, um método cromatográfico para detecção e quantificação de mangiferina foi otimizado no sistema de cromatografia líquida (UHPLC), utilizando extratos-teste de resíduo de manga e os padrões analíticos dos dois compostos selecionados como marcadores de referência desta matriz. Como pode ser visto na Figura 4.1, é possível verificar a identificação das bandas relativas a cada analito no extrato (A), em comparação com o tempo de retenção obtido com os padrões analíticos (B). Estes cromatogramas foram registrados de acordo com a absorção no comprimento de onda de 350 nm.

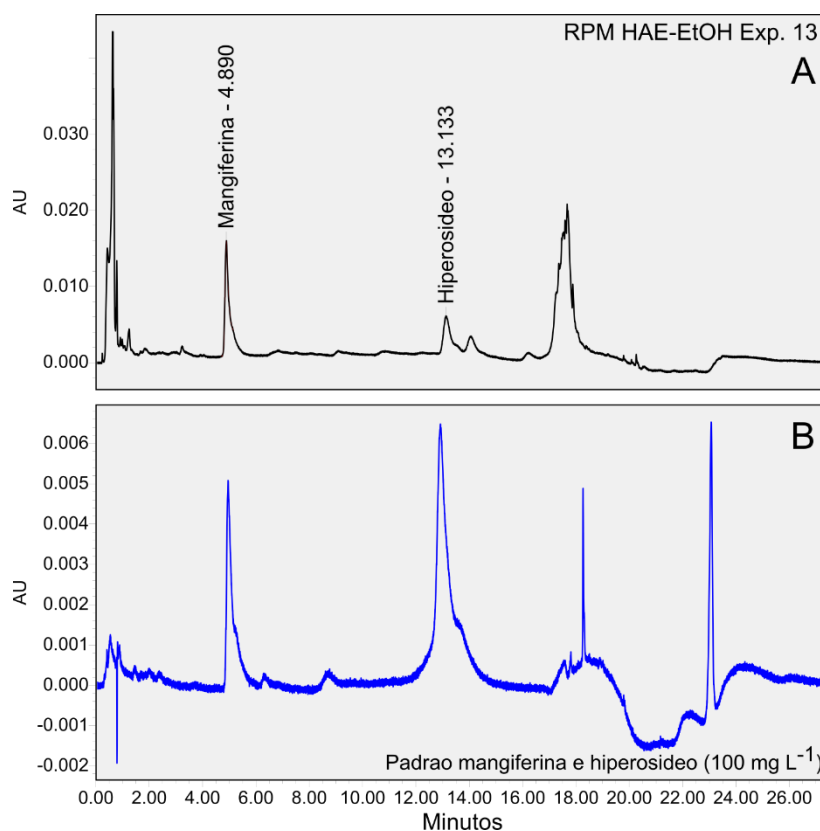


FIGURA 4.1 – Cromatogramas de extrato proveniente de extração assistida por homogeneizador (A) e de solução padrão de mangiferina e hiperosídeo (B), registrados em 350 nm.

Também é possível observar, mais claramente no gráfico dos padrões analíticos, que houve diminuição da eficiência de retenção da fase estacionária utilizada, resultando em bandas com formato de base larga e presença de “ombros”. A observação deste fenômeno foi feita após a otimização do método cromatográfico. Desta forma, este método descrito foi utilizado apenas para as extrações utilizando a técnica de EAH-EtOH, visto que foram considerados como positivos todos os parâmetros de qualidade da técnica analítica, como será descrito em seguida. Para as demais técnicas de extração e ensaios comparativos, outro método cromatográfico foi desenvolvido e será descrito na próxima seção.

Para avaliação do parâmetro de especificidade, além da observação da separação das bandas no cromatograma, também foram verificados os perfis de absorção UV das bandas investigadas (Figura 4.2 e Figura 4.3 B), em comparação com os respectivos padrões (A), que demonstraram serem semelhantes para ambos analitos. A comparação em diferentes posições da banda também demonstrou consistência no formato do perfil UV e nos pontos de absorção máxima, como pode ser visto no item C das Figura 4.2 e Figura 4.3. É possível observar que a mangiferina apresenta pontos de absorção máxima em 240, 256, 318 e 365 nm, enquanto no hiperosídeo isto ocorre em 254 e 354 nm. Visando a seletividade em relação a outros compostos presentes no perfil químico do extrato, o comprimento de onda de 350 nm foi, portanto, selecionado para identificação e quantificação dos analitos. Por fim, o último parâmetro de avaliação de especificidade foi a comparação das áreas das bandas investigadas em extratos puros e fortificados (com adição dos respectivos padrões analíticos). Na Figura 4.4 é possível observar o aumento da área das bandas investigadas após adição de solução dos padrões (B), indicando mais uma vez a identificação das bandas de mangiferina e hiperosídeo.

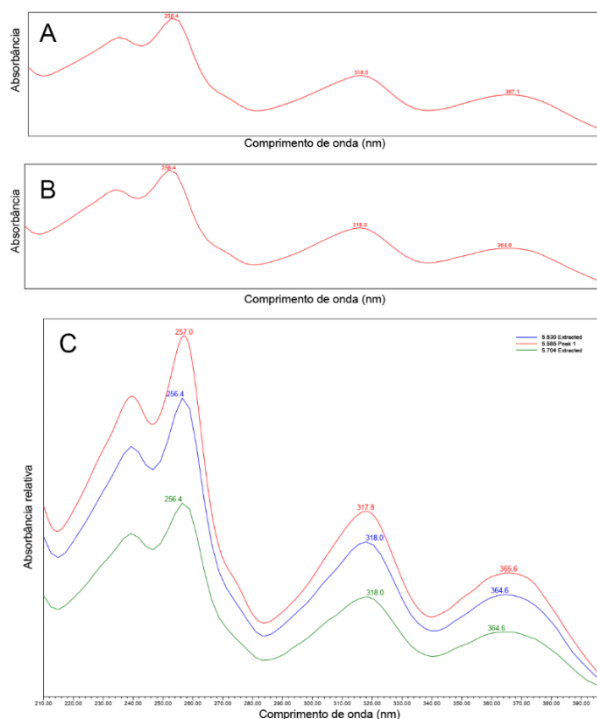


FIGURA 4.2 – Perfil de absorção UV da banda cromatográfica de mangiferina em solução padrão (A) e em extrato de resíduo de manga (B). Pureza de banda para mangiferina em extrato de resíduo de manga de acordo com o perfil UV em três diferentes pontos da banda (C).

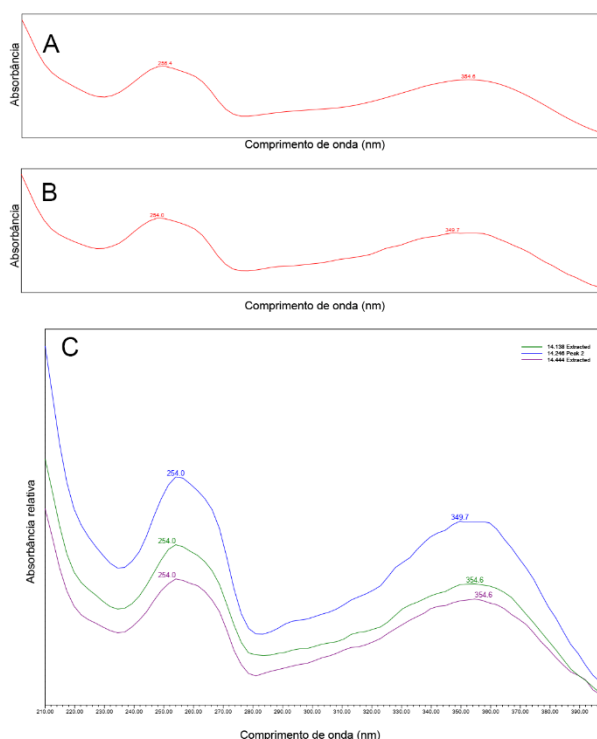


FIGURA 4.3 – Perfil de absorção UV da banda de hiperosídeo em solução padrão (A) e em extrato de resíduo de manga (B). Pureza de banda para mangiferina em extrato de resíduo de manga de acordo com o perfil UV em três diferentes pontos da banda (C).

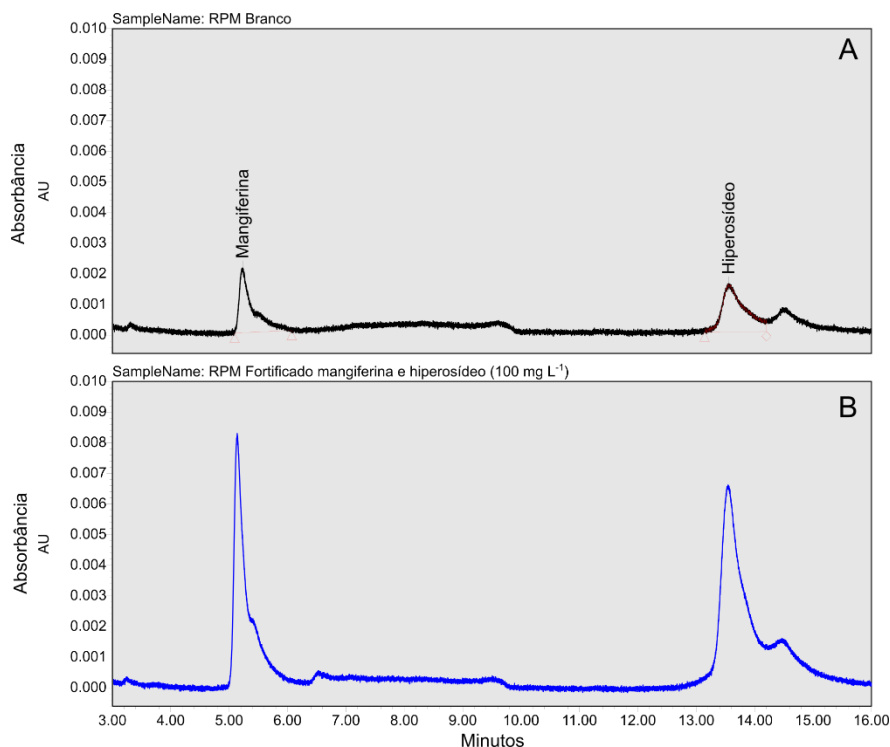


FIGURA 4.4 – Cromatogramas de extrato de manga obtido a partir do método EAH-EtOH (A) e o mesmo extrato fortificado com 50 mg L⁻¹ de mangiferina e hiperosídeo (B), registrados em 350 nm.

As curvas analíticas foram realizadas a partir de soluções-estoque dos padrões, com e sem a presença de uma quantidade fixa do extrato. Após o cálculo das regressões lineares, foi possível comparar os coeficientes obtidos nos dois tipos de curva analítica (Figura 4.5). O parâmetro α (razão entre os coeficientes angulares) calculado demonstrou semelhantes coeficientes angulares para o hiperosídeo (α próximo de 1), enquanto para a mangiferina foi observada uma divergência entre os coeficientes ($\alpha=0,693$). Isto demonstra certa influência da matriz (extrato de resíduo de manga) na quantificação da mangiferina, que pode estar relacionada tanto ao perfil químico desta matriz, alterando a qualidade da obtenção da área de banda, quanto aos parâmetros observados diminuição da eficiência de retenção da fase estacionária (CSH C18). Estes efeitos tornam a base da banda mais larga e, conseqüentemente, também influenciam na obtenção de sua área. Apesar disso, as quantificações foram realizadas utilizando a curva de calibração feita apenas em solvente para ambos analitos, especialmente devido ao menor erro obtido nas regressões lineares feitas para este tipo de curva, que foram traduzidos em melhores parâmetros de LD e LQ.

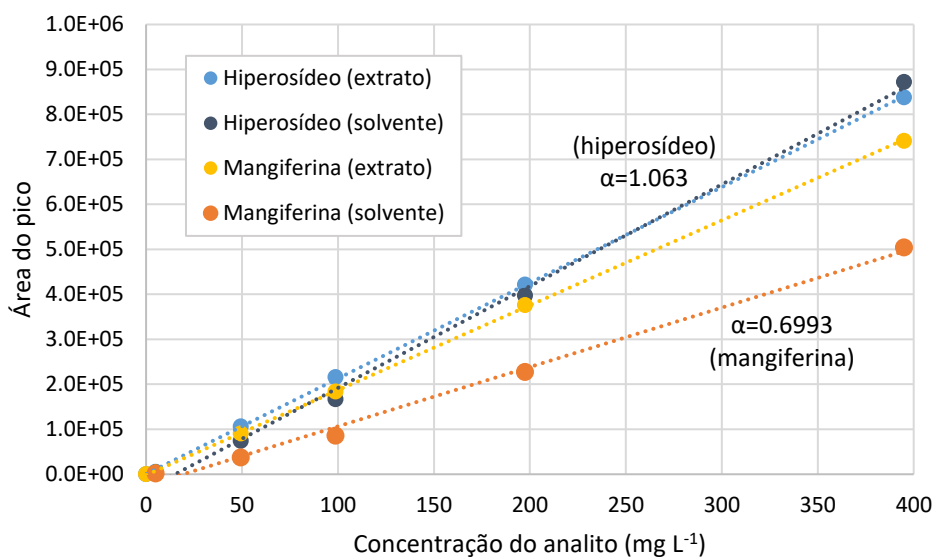


FIGURA 4.5 – Curvas analíticas utilizadas na quantificação de mangiferina e hiperosídeo dos experimentos obtidos nos ensaios de EAH-EtOH.

A Tabela 4.1 mostra os valores da equação da regressão linear e as figuras de mérito avaliadas para este método analítico. Todos estes parâmetros foram considerados aceitáveis de acordo com os principais guias para desenvolvimento e validação de metodologias analíticas utilizando cromatografia líquida, especialmente as diretrizes dadas pelo ICH¹⁸⁰.

TABELA 4.1 – Curvas analíticas e figuras de mérito relativas ao método cromatográfico para detecção e quantificação de mangiferina e hiperosídeo utilizado na extração EAH-EtOH.

Composto	Equação	R ²	LD	LQ	Recuperação	Erro intra-diário	Erro inter-diário
			mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	%	%	%
Mangiferina	$y=1887,40x - 1712,93$	0,99985	6,11	18,51	80,4 - 114,3	1,0 - 4,4	0,4 - 4,7
Hiperosídeo	$y = 2126,70x + 247,63$	0,99984	6,38	19,34	89,3 - 109,1	0,9 - 4,8	0,9 - 2,2

Os coeficientes de determinação calculados a partir da regressão linear foram próximos de 1 ($R^2 > 0,999$), demonstrando a linearidade analítica da correlação área de banda vs. concentração do analito entre os níveis de concentração selecionados. Os LDs e LQs foram considerados razoáveis, de acordo com a concentração mínima da curva de calibração (5 mg L⁻¹), cuja área de banda demonstrou estar próxima ao erro da leitura do detector de UV (ruído). Isto se deu,

principalmente, pela escolha do volume de injeção em apenas 1 μL , que permitiu uma eficiente separação entre as bandas presentes no cromatograma do extrato. Desta forma, foi priorizada uma melhor separação entre as bandas em detrimento do desenvolvimento um método mais sensível de quantificação, que no caso dos extratos analisados não seria necessário por conta da presença de concentrações dos analitos superiores a 20 mg L^{-1} . Por fim, os valores encontrados de recuperação estão dentro dos padrões de qualidade estabelecidos pelo ICH (80-120%) e os valores de erro intra- e inter-diários calculados a partir dos ensaios de recuperação não ultrapassaram 5% de variação entre as injeções. Estes valores demonstram consistência em termos de exatidão e precisão na quantificação de mangiferina e hiperosídeo para este método analítico.

4.1.1.2 – Extração Assistida por Micro-ondas (EAM), Dispersão de Matriz em Fase Sólida (DMFS) e demais análises

Um novo método analítico foi desenvolvido, seguindo o mesmo caminho metodológico anterior, para a obtenção de uma nova corrida cromatográfica utilizando o mesmo sistema, porém com uma fase estacionária diferente (BEH C8). A nova fase estacionária demonstrou uma capacidade de retenção mais eficiente, com formato de banda e tempos de retenção consistentes, como pode ser visto na Figura 4.6. É possível observar a comparação entre as corridas cromatográficas com solução dos padrões (A) e com os extratos, obtidos com as técnicas de extração de DMFS (B) e EAM (C). Na Figura 4.7 é possível verificar a comparação entre os cromatogramas de um extrato puro e fortificado com a adição dos padrões analíticos (100 mg L^{-1}), com aumento das áreas das bandas investigadas (cromatograma B). Neste gradiente de eluição, a mangiferina foi detectada em tempos de retenção próximos de 3,5 minutos, enquanto o hiperosídeo aparece por volta de 6,25 minutos. O comprimento de onda para registro do cromatograma e integração das áreas das bandas foi mantido em 350 nm.

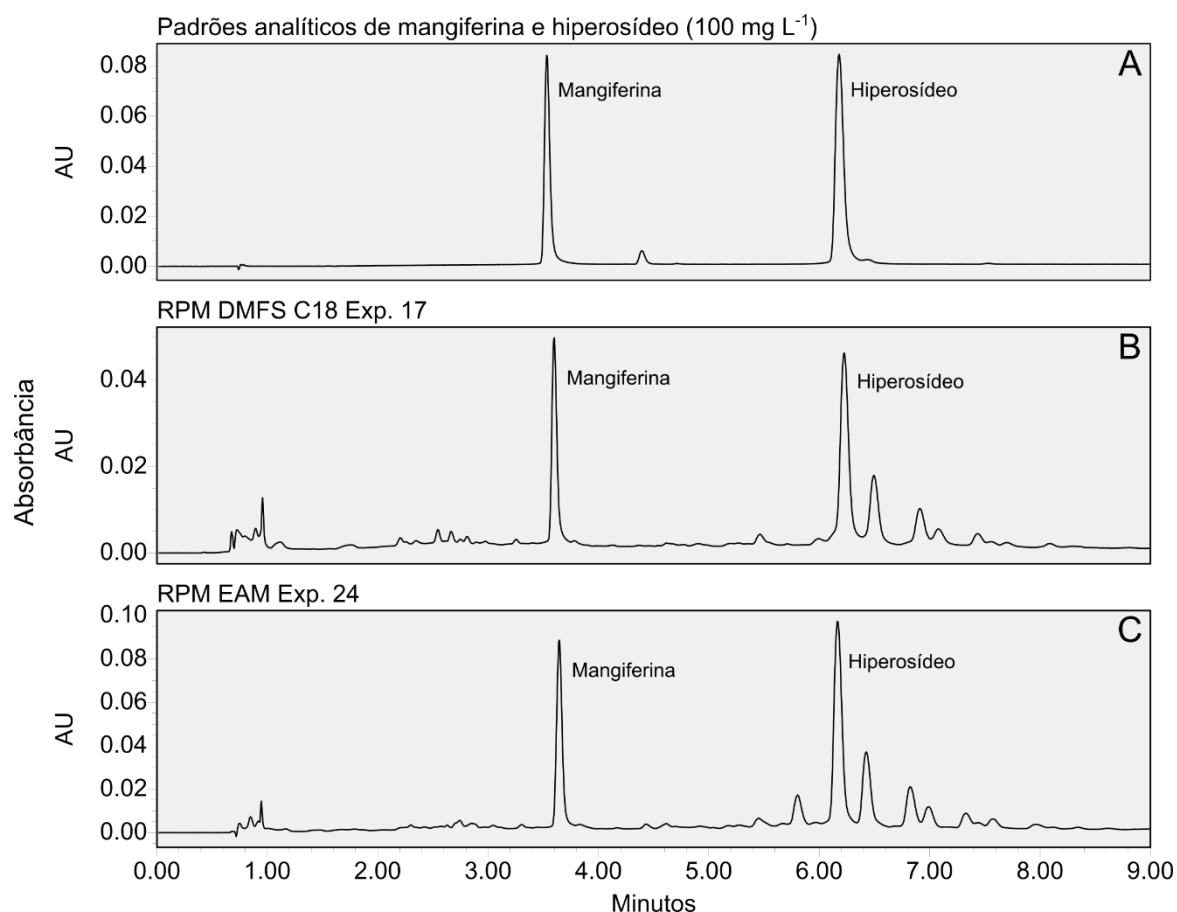


FIGURA 4.6 – Cromatogramas das soluções padrão de mangiferina e hiperosídeo (A) e extratos provenientes de extração DMFS (B) e EAM (C), registrados em 350 nm.

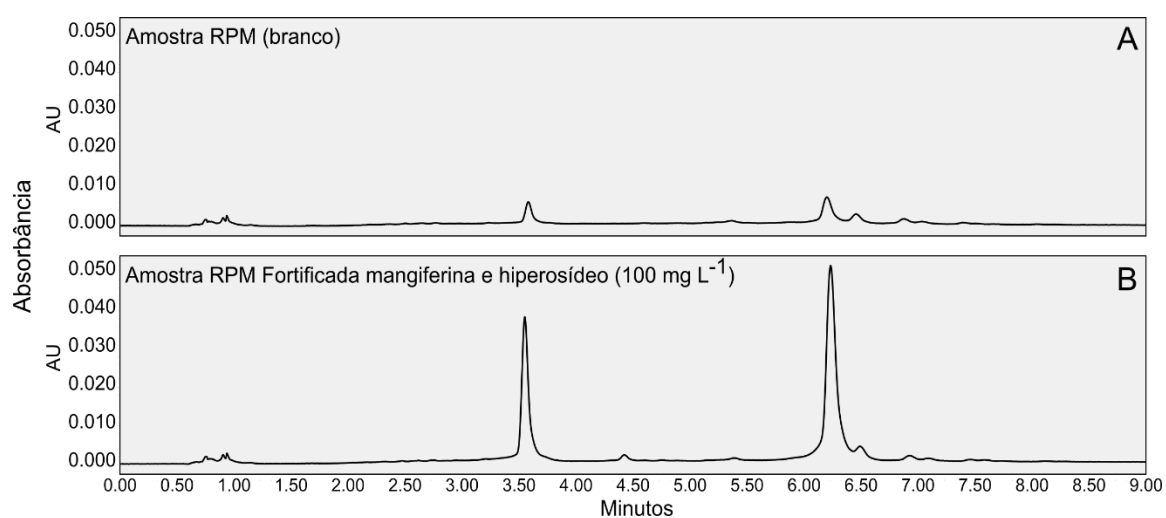


FIGURA 4.7 – Cromatogramas de extrato de manga obtidos a partir do método DMFS (A) e o mesmo extrato fortificado com 100 mg L⁻¹ de mangiferina e hiperosídeo (B), registrados em 350 nm.

Semelhante ao que foi encontrado no método anterior, a absorção UV das bandas investigadas nos extratos teve perfil similar aos obtidos em soluções dos seus respectivos padrões (Figura 4.8). Complementando a figura de mérito de especificidade, os perfis UV das bandas nos extratos demonstraram pouca variação em diferentes pontos, como pode ser visto na Figura 4.9.

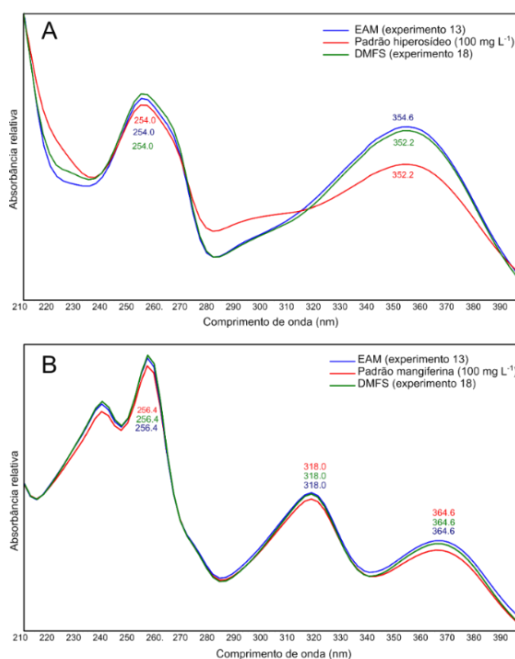


FIGURA 4.8 – Perfil UV das bandas de hiperosídeo (A) e mangiferina (B) encontrados em solução padrão de 100 mg L⁻¹ (vermelho) e nos extratos obtidos pelos métodos de DMFS (verde) e EAM (azul).

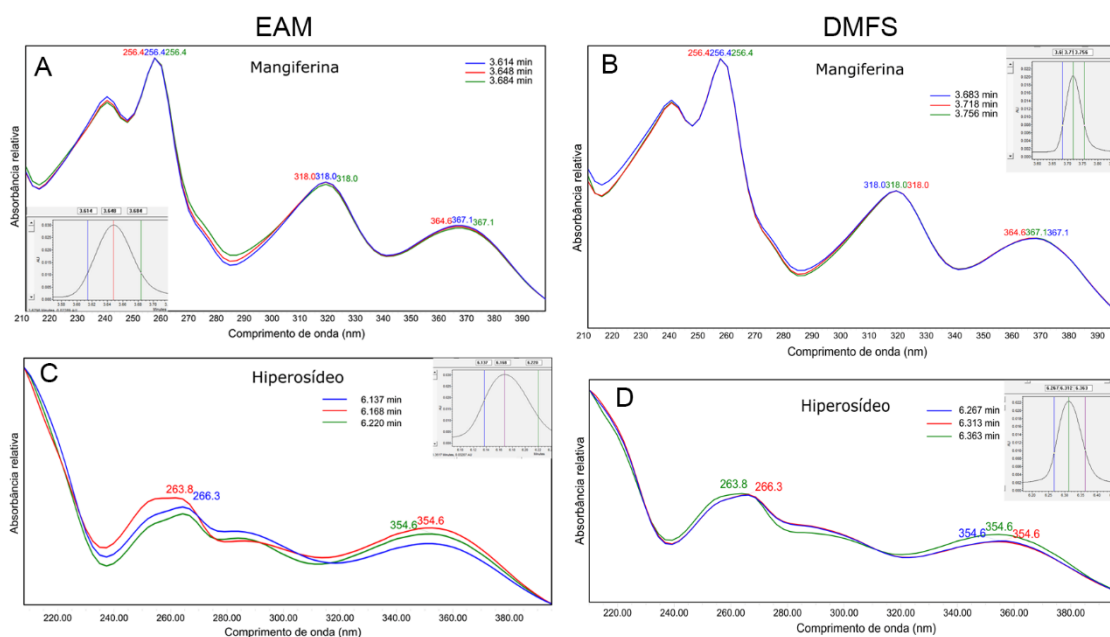


FIGURA 4.9 – Pureza de banda determinada pelo perfil UV de mangiferina (A, B) e hiperosídeo (C, D) em três diferentes tempos de retenção das respectivas bandas cromatográficas dos extratos obtidos a partir da extração por EAM e DMFS.

Diferente do encontrado no método anterior, comparando os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas no extrato e no solvente (Figura 4.10), foi possível obter valores de α próximos de 1 para mangiferina ($\alpha=0,953$) e hiperosídeo ($\alpha=1,009$). Desta forma, mesmo encontrando valores dos erros (resíduos) da regressão linear semelhantes em ambos os tipos de curva analítica, a realizada apenas em solvente foi utilizada para prosseguimento das quantificações. Podemos observar, então, que a divergência encontrada para a curva da mangiferina no método anterior provavelmente se deu pela influência do formato de banda e demais fatores influenciados pela capacidade de retenção menos eficiente da fase estacionária. Na Tabela 4.2 podem-se observar as equações, os coeficientes de determinação e os LDs e LQs das curvas analíticas de mangiferina e hiperosídeo, todos dentro dos valores aceitáveis assim como discutido na seção anterior (Item 4.1.1.1).

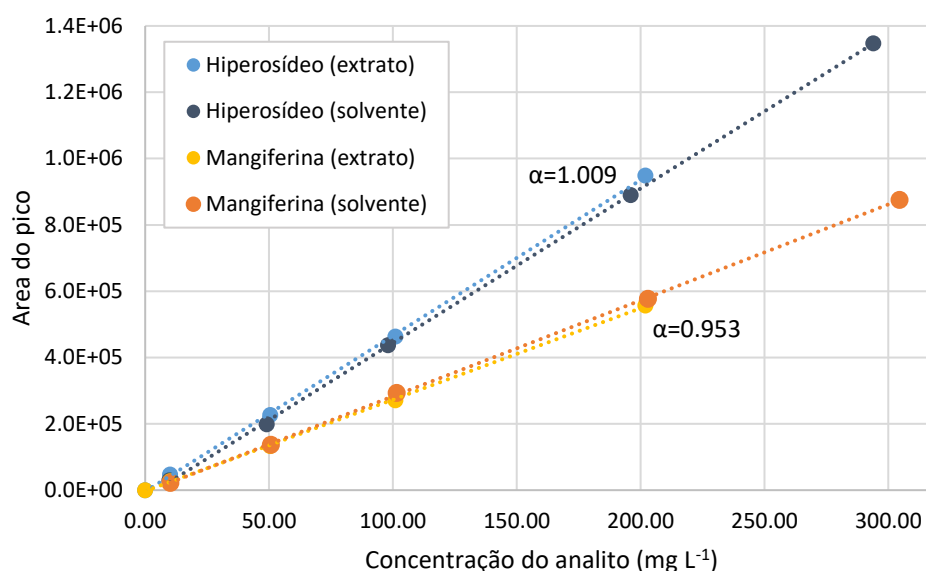


FIGURA 4.10 – Curvas analíticas utilizadas na quantificação de mangiferina e hiperosídeo dos experimentos obtidos nos ensaios de DMFS, EAM e demais ensaios.

TABELA 4.2 – Curvas analíticas e figuras de mérito relativas ao método cromatográfico para detecção e quantificação de mangiferina e hiperosídeo nas extrações DMFS, EAM e demais ensaios.

Composto	Equação	R ²	LD	LQ
			mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
Mangiferina	$y = 2893,57x - 6429,53$	0,99984	3,98	13,25
Hiperosídeo	$y = 4653,77x - 21158,23$	0,99989	3,21	10,69

Por fim, também foram avaliadas as figuras de mérito de exatidão e precisão em termos dos ensaios de recuperação e erros intra- e inter-diários, respectivamente. A partir dos dados da Tabela 4.3, é possível observar valores de recuperação dentro da faixa aceitável para ambas técnicas de extração (80-120%), bem como valores de erro que chegaram, em seu máximo, até 5,2% de variação entre as injeções.

TABELA 4.3 – Ensaios de recuperação e erros intra- e inter-diários realizados para as extrações de DMFS e EAM.

Método	Composto	Concentração	Recuperação	Erro intra-diário	Erro inter-diário
		mg L ⁻¹	%	%	%
DMFS	Mangiferina	50,80	99 - 100	0,3 - 0,8	1,5 - 3,1
		20,32	103 - 107	1,5 - 3,1	0,6 - 2,1
	Hiperosídeo	50,80	109 - 115	0,7 - 3,1	0,5 - 2,2
		20,32	111 - 113	1,7 - 3,2	0,6 - 4,9
EAM	Mangiferina	50,80	94 - 96	1,2 - 5,2	0,4 - 0,1
		20,32	97 - 105	1,0 - 3,3	0,4 - 2,7
	Hiperosídeo	50,80	100 - 102	0,7 - 1,8	0,6 - 1,2
		20,32	100 - 111	1,1 - 2,3	0,4 - 1,1

4.1.1.3 – Extração Assistida por Homogeneizador em soluções de líquidos iônicos (EAH-LIs)

O método analítico desenvolvido para as extrações com os líquidos iônicos foi desenvolvido em outro equipamento cromatográfico, devido à realização desta etapa do trabalho em estágio doutoral no exterior (*Leuphana University, Alemanha*). Utilizando um *software* de conversão de métodos cromatográficos entre diferentes equipamentos (*Waters column calculator*), foi possível obter uma eluição gradiente equivalente à descrita no método anterior. Por conta desta equivalência, assim como por falta de tempo hábil de realização de todos os ensaios necessários, não foram realizadas as avaliações das figuras de mérito de precisão e exatidão.

Por comparação entre os tempos de retenção e por conta do perfil cromatográfico já encontrado nos métodos anteriores, foi possível então identificar as bandas de mangiferina (11 min) e hiperosídeo (20 min) nos extratos para posterior quantificação (Figura 4.11). A seletividade deste método foi avaliada pela comparação entre um extrato puro e o mesmo extrato fortificado com adição dos padrões, obtendo

resultados semelhantes aos métodos anteriores, bem como a comparação entre os perfis UV das bandas investigadas em extrato e padrões (Figura 4.12).

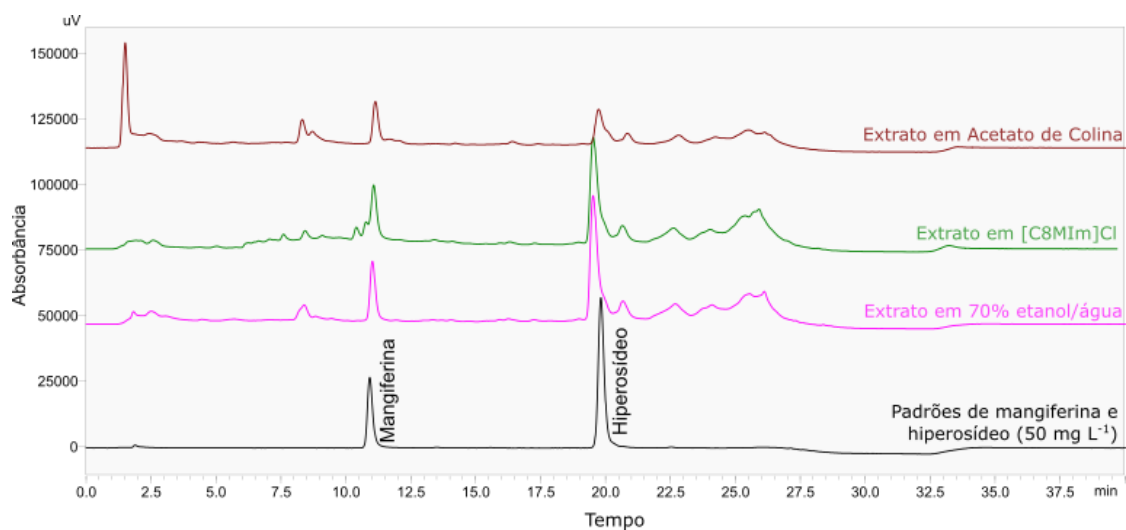


FIGURA 4.11 – Sobreposição de cromatogramas (350 nm) de padrões analíticos de mangiferina e hiperosídeo (em preto) e extratos obtidos a partir de diversos solventes, de acordo com método EAH-LIs.

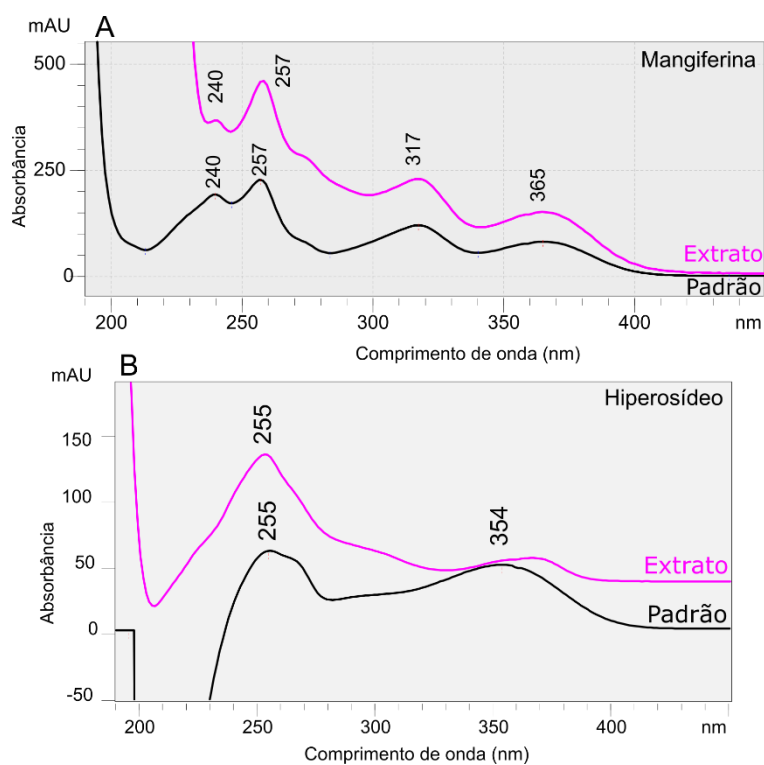


FIGURA 4.12 – Perfil de absorção UV das bandas de mangiferina (A) e hiperosídeo (B) em solução dos padrões e no extrato obtido a partir do método EAH-LIs ([C₈MIm] Cl).

Foram obtidas, então, as curvas analíticas de mangiferina e hiperosídeo para a quantificação dos mesmos nos extratos provenientes da metodologia EAH-LIs.

Os detalhes das curvas analíticas podem ser vistos na Tabela 4.4. Os coeficientes de determinação encontrados são adequados, bem como os limites de detecção e quantificação, que ficaram ligeiramente menores em comparação aos outros métodos devido ao detector utilizado neste ser mais sensível.

TABELA 4.4 – Curvas analíticas de mangiferina e hiperosídeo utilizadas na metodologia de extração EAH-LIs e seus limites de detecção e quantificação.

Composto	Equação	R ²	LD	LQ
			mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
Mangiferina	$y = 7970,67x - 4919,90$	0,9998	2,47	8,24
Hiperosídeo	$y = 15208,46x - 4519,21$	0,9998	2,87	9,56

4.1.2 – Extrações, planejamentos fatoriais e superfícies de resposta

4.1.2.1 – Extração Assistida por Homogeneizador em soluções etanólicas (EAH-EtOH)

Dadas as metodologias analíticas para detecção e quantificação de mangiferina e hiperosídeo, foi possível executar os planejamentos fatoriais preparados para cada técnica de extração estudada. O planejamento do tipo *Box-Behnken* foi utilizado para esta e outras otimizações com 3 a 4 variáveis estudadas neste trabalho por sua alta eficiência de observação dos dados e um valor reduzido de experimentos. Porém, por ser um planejamento do tipo esférico, este não necessita de experimentos em valores simultaneamente extremos das variáveis selecionadas (e.g. todas as variáveis em nível mínimo), evitando a obtenção de extratos que ultrapassem os níveis analíticos mínimos de detecção e quantificação¹⁸⁷. As respostas relativas ao planejamento fatorial para a técnica EAH-EtOH (Tabela 4.5), em termos de eficiência de extração em mg kg⁻¹, demonstraram variação significativa entre mínimos e máximos, permitindo a avaliação dos efeitos das variáveis de forma ampla. Dentre os experimentos, a mangiferina foi quantificada entre 214,2 e 342,4 mg kg⁻¹, enquanto a resposta de hiperosídeo variou entre 117,2 e 235,7 mg kg⁻¹.

A análise dos efeitos das variáveis (Apêndice 1) mostrou grande influência positiva da concentração de etanol em água (X₁) para as respostas de ambos analitos (>90%), isto é, respostas maiores foram encontradas quando esta variável estava em níveis superiores. A princípio, as duas outras variáveis demonstraram ter um efeito pequeno nas respostas, fator que foi melhor avaliado nos gráficos de superfícies de resposta, plotados a partir do modelo polinomial calculado das respostas de mangiferina (Figura 4.13) e hiperosídeo (Figura 4.14).

TABELA 4.5 – Planejamento fatorial de *Box-Behnken* para o método EAH-EtOH e respectivas respostas de mangiferina e hiperosídeo.

Etanol/Água (X ₁)		Amostra-Solvente (X ₂)		Tempo (X ₃)		Respostas		
% v/v		g mL ⁻¹		min		mg kg ⁻¹		
Exp.	Cod.	Real	Cod.	Real	Cod.	Real	Mang.	Hiper.
01	-1	30	-1	0,15	0	2,75	219,0	148,4
02	1	80	-1	0,15	0	2,75	332,3	218,6
03	-1	30	1	0,50	0	2,75	214,2	117,2
04	1	80	1	0,50	0	2,75	319,2	223,2
05	-1	30	0	0,33	-1	0,50	238,2	148,4
06	1	80	0	0,33	-1	0,50	329,2	234,2
07	-1	30	0	0,33	1	5,00	235,0	138,1
08	1	80	0	0,33	1	5,00	337,8	241,7
09	0	55	-1	0,15	-1	0,50	317,3	221,5
10	0	55	1	0,50	-1	0,50	323,7	203,4
11	0	55	-1	0,15	1	5,00	326,9	235,7
12	0	55	1	0,50	1	5,00	320,2	206,4
13	0	55	0	0,33	0	2,75	340,1	230,3
14	0	55	0	0,33	0	2,75	339,0	228,0
15	0	55	0	0,33	0	2,75	342,4	231,9

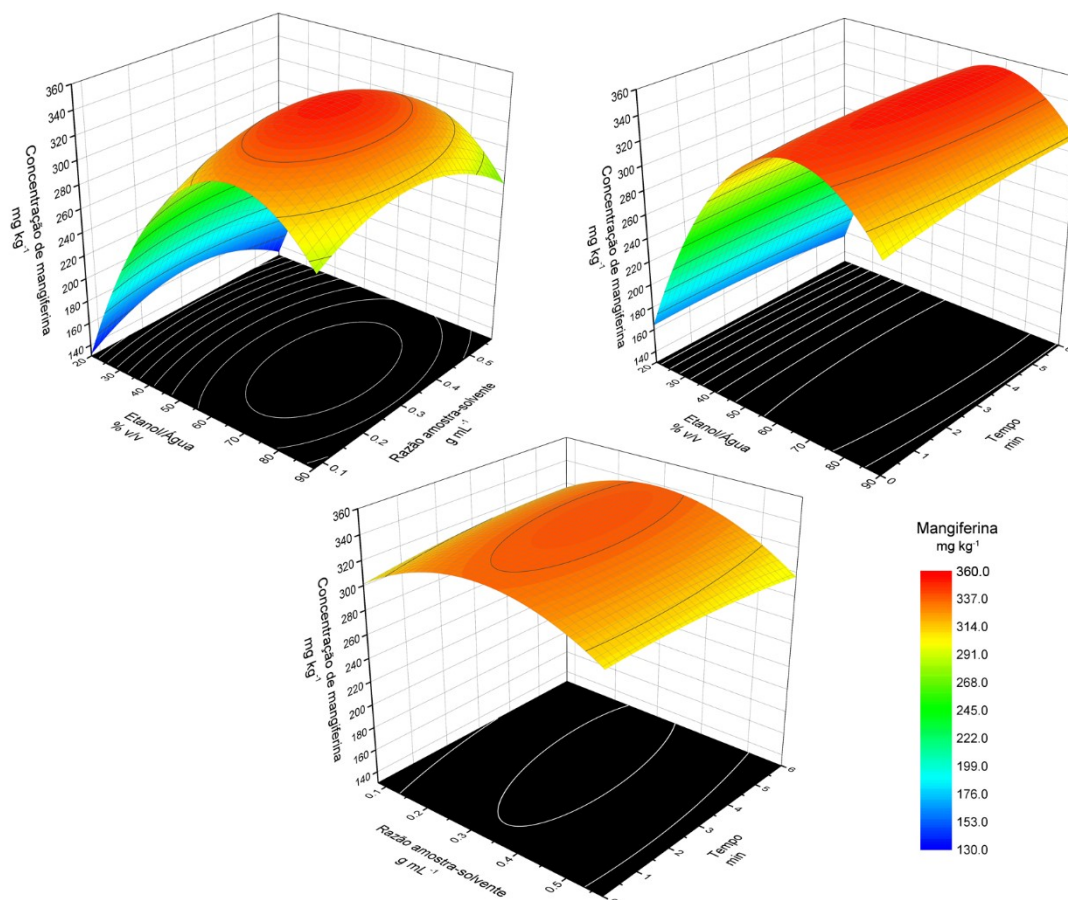


FIGURA 4.13 – Metodologia de superfície de resposta para a extração por EAH-EtOH de mangiferina.

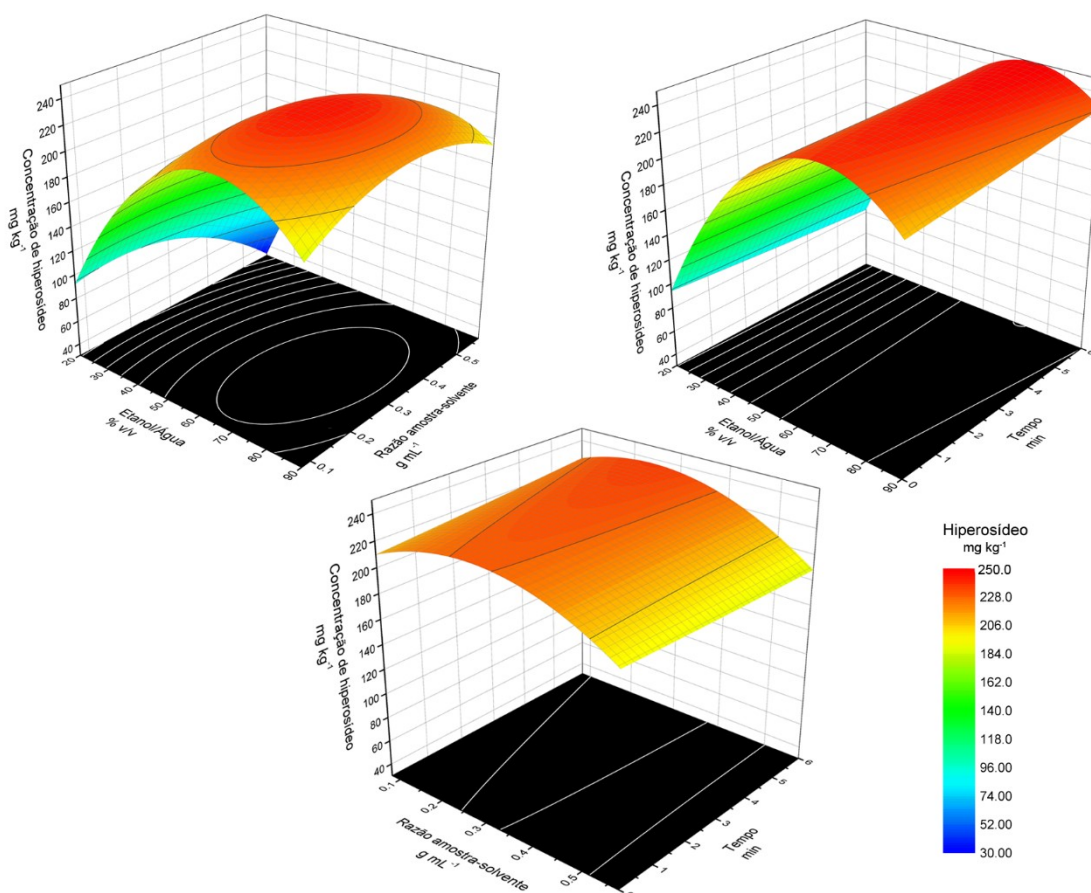


FIGURA 4.14 – Metodologia de superfície de resposta para a extração por EAH-EtOH de hiperosídeo.

Os modelos polinomiais demonstraram bons valores de ajuste ($R^2 > 0,99$) e testes estatísticos de p-valores –média quadrática da regressão em relação aos resíduos significante e falta de ajuste em comparação com o erro puro não significante (tabela ANOVA, Apêndice 2).

Analisando as superfícies de resposta, observa-se que há uma influência majoritária das variáveis X_1 e X_2 para os dois analitos, enquanto o tempo de extração não mostrou influência significativa nas respostas dentro da faixa de níveis selecionada. Os níveis ótimos calculados a partir do modelo polinomial foram: $X_1=67,7\%_{v/v}$, $X_2=0,29 \text{ g mL}^{-1}$ e $X_3=4,5 \text{ min}$, para a mangiferina ($354,4 \text{ mg kg}^{-1}$); $X_1=70,1\%_{v/v}$, $X_2=0,28 \text{ g mL}^{-1}$ e $X_3=5,0 \text{ min}$, para o hiperosídeo ($248,7 \text{ mg kg}^{-1}$). Como os níveis que induzem máxima resposta são semelhantes entre os analitos, não foi dado prosseguimento ao cálculo da função desejabilidade.

Para otimizar as concentrações dos analitos, foi avaliado que a variável tempo de extração possui baixa influência nas respostas. Assim, apesar de

recomendáveis tempos de extração no nível máximo, a superfície de resposta evidencia que a utilização de tempos de extração menores teria um efeito deletério baixo sobre a eficiência de extração. Isto significa que, dentro dos níveis estudados, a extração pode ser realizada em apenas 30 segundos, obtendo respostas similares às obtidas no ponto ótimo. Por outro lado, este efeito observado pode ser consequência da estreita faixa de valores selecionada para esta variável, que poderia demonstrar maior influência nos resultados em tempos maiores. O nível máximo selecionado (5 minutos) se deu por dois principais fatores: limitação do equipamento utilizado, cujo aquecimento do motor pode causar mal funcionamento após longos tempos de uso; e a procura por métodos de extração verdes, onde métodos rápidos – e conseqüentemente, com menores gastos energéticos – são desejados. O uso de baixos tempos de extração é uma prática comum na otimização desta técnica^{83,188}. Trabalhos prévios desenvolvidos no grupo de pesquisa também demonstraram o menor efeito do tempo e da velocidade de rotação nesta técnica para a extração de compostos semelhantes^{81,189}.

A concentração de etanol em água (X_1), por outro lado, demonstrou maior influência na extração, destacando um fator importante em extrações sólido-líquido: o solvente utilizado e suas propriedades, especialmente em termos de solubilidade e outras características físico-químicas que influenciam nos fenômenos de transporte que ocorrem nas extrações, como tensão superficial e viscosidade⁵⁹. Por ser uma extração rápida, esse método demonstra potencialidade para uso em escalas piloto e industrial, com disponibilidade comercial de dispersores em lote com capacidade de até 6.000 litros¹⁹⁰ e dispersores em linha que chegam a processar até 125.000 litros por hora¹⁹¹. Apesar disso, a velocidade de cisalhamento é limitada pelas maiores escalas, chegando até apenas 1.000 rpm nos dispersores em lote, o que pode prejudicar a eficiência de extração neste caso.

4.1.2.2 – Extração Assistida por Micro-ondas (EAM)

O planejamento experimental de *Box-Behnken* e as respostas em termos de eficiência de extração de mangiferina e hiperosídeo podem ser vistas na Tabela 4.6. É possível verificar que houve extração consistente de ambos analitos, com concentrações ligeiramente superiores de mangiferina, com média em 238,2 mg kg⁻¹, em comparação com hiperosídeo (média de 226,4 mg kg⁻¹). Os

melhores resultados foram encontrados no experimento 1 para mangiferina (261,4 mg kg⁻¹) e experimento 23 para hiperosídeo (244,4 mg kg⁻¹).

Análise dos efeitos primários e secundários das variáveis de extração por EAM (Apêndice 1) mostram um maior efeito negativo do parâmetro X₂ (razão amostra/solvente), responsável por 77,9 e 73,3% do efeito total para mangiferina e hiperosídeo, respectivamente. O efeito negativo demonstra uma maior eficiência de extração em níveis baixos da variável, como pode ser visto nos experimentos 1, 2, 13, 15, 21 e 23 da Tabela 4.6. A variável X₁ (concentração de etanol em água) também mostrou ter efeito negativo na resposta de concentração de mangiferina (8,9% do efeito total). Efeitos secundários de interação entre as variáveis X₁ e X₂ obtiveram maiores efeitos negativos para a resposta de concentração de hiperosídeo, somando 14,9% do efeito total para este analito, o que significa que esta resposta obteve maiores valores quando ambas variáveis estiveram em níveis baixos. As variáveis X₃ (tempo) e X₄ (temperatura) tiveram pouca influência nas respostas finais.

Modelos polinomiais de segunda ordem foram obtidos a partir das respostas do desenho experimental de *Box-Behnken*, com valores de coeficiente de determinação (R²) de 0,97 e 0,89 para mangiferina e hiperosídeo, respectivamente, e testes estatísticos dentro dos níveis aceitáveis (Apêndice 2). As superfícies de resposta obtidas a partir deste modelo estão apresentadas nas Figura 4.15 e Figura 4.16. As superfícies confirmam que houve obtenção de valores máximos de resposta em níveis mínimos de X₁ e X₂ para mangiferina. Já para o hiperosídeo, os valores de X₁ que maximizaram a resposta estiveram próximos do nível máximo, enquanto X₂ demonstrou otimizar a extração próxima em níveis médios. Estes fatores são confirmados pelos parâmetros ótimos calculados: para mangiferina, 75% de etanol em água, 0,15 g mL⁻¹ de razão amostra/solvente, 10 minutos e 42,8 °C (269,9 mg kg⁻¹); para hiperosídeo, 90% de etanol em água, 0,20 g mL⁻¹ de razão amostra/solvente, 2 minutos e 70 °C (241,4 mg kg⁻¹).

TABELA 4.6 – Planejamento fatorial *Box-Behnken* para o método EAM e as respectivas respostas de mangiferina, hiperosídeo e da função desejabilidade.

Exp.	Etanol/Água (X ₁)		Amostra-solvente (X ₂)		Tempo (X ₃)		Temperatura (X ₄)		Respostas		
	Cod.	Real	Cod.	Real	Cod.	Real	Cod.	Real	Mangiferina	Hiperosídeo	Desejabili-
	-	%v/v	-	g mL ⁻¹	-	min	-	°C	mg kg ⁻¹		dade
1	-1	75,0	-1	0,15	0	6	0	55	261,4	222,0	0,72
2	1	90,0	-1	0,15	0	6	0	55	252,6	234,9	0,82
3	-1	75,0	1	0,50	0	6	0	55	229,1	212,9	0,36
4	1	90,0	1	0,50	0	6	0	55	206,8	202,8	0,00
5	-1	75,0	0	0,33	-1	2	0	55	251,0	235,9	0,81
6	1	90,0	0	0,33	-1	2	0	55	242,4	234,1	0,71
7	-1	75,0	0	0,33	1	10	0	55	251,4	236,8	0,83
8	1	90,0	0	0,33	1	10	0	55	238,9	232,3	0,66
9	-1	75,0	0	0,33	0	6	-1	40	247,6	235,2	0,77
10	1	90,0	0	0,33	0	6	-1	40	226,1	225,3	0,45
11	-1	75,0	0	0,33	0	6	1	70	232,7	228,8	0,56
12	1	90,0	0	0,33	0	6	1	70	230,9	225,8	0,51
13	0	82,5	-1	0,15	-1	2	0	55	251,7	224,9	0,69
14	0	82,5	1	0,50	-1	2	0	55	218,2	201,8	0,13
15	0	82,5	-1	0,15	1	10	0	55	260,3	236,4	0,90
16	0	82,5	1	0,50	1	10	0	55	226,7	211,2	0,32
17	0	82,5	0	0,33	-1	2	-1	40	235,1	226,0	0,56
18	0	82,5	0	0,33	1	10	-1	40	250,3	240,0	0,85
19	0	82,5	0	0,33	-1	2	1	70	235,5	231,2	0,61
20	0	82,5	0	0,33	1	10	1	70	236,6	233,9	0,65
21	0	82,5	-1	0,15	0	6	-1	40	250,4	229,4	0,73
22	0	82,5	1	0,50	0	6	-1	40	209,8	198,3	0,00
23	0	82,5	-1	0,15	0	6	1	70	249,9	244,4	0,89
24	0	82,5	1	0,50	0	6	1	70	211,7	211,8	0,16
25	0	82,5	0	0,33	0	6	0	55	239,4	232,3	0,66
26	0	82,5	0	0,33	0	6	0	55	245,5	234,4	0,74
27	0	82,5	0	0,33	0	6	0	55	240,9	229,4	0,65

A partir das superfícies de resposta e dos parâmetros ótimos, é possível observar que diferentes níveis máximos das variáveis foram obtidos para cada analito. Desta forma, foi calculada a função desejabilidade para estas respostas, cujos valores também podem ser encontrados na Tabela 4.6. O modelo calculado a partir das respostas de desejabilidade demonstrou bons parâmetros estatísticos na análise de variância (Apêndice 2) e foi plotado em superfícies de resposta (Figura 4.17).

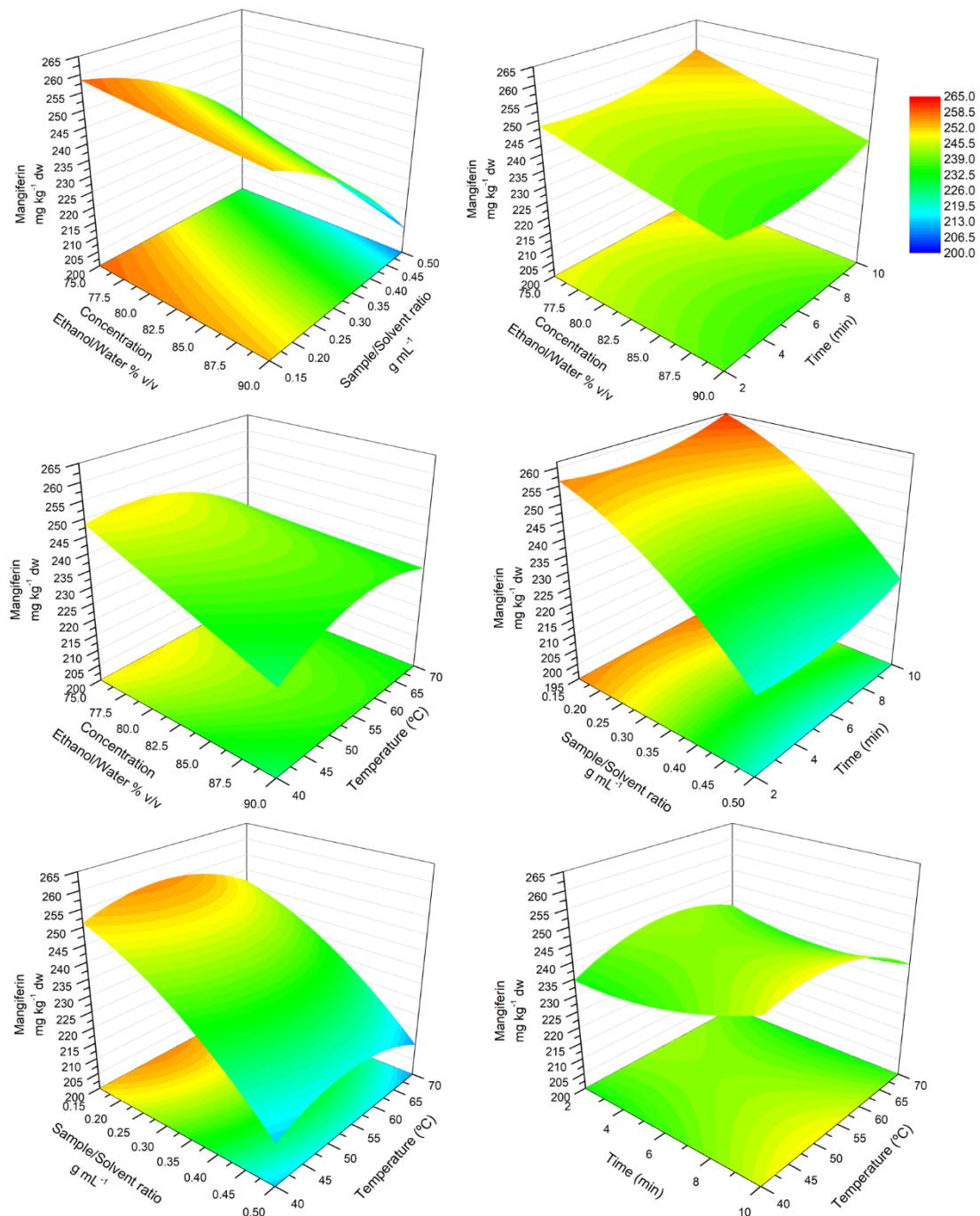


FIGURA 4.15 – Metodologia de superfície de resposta para a extração por EAM de mangiferina.

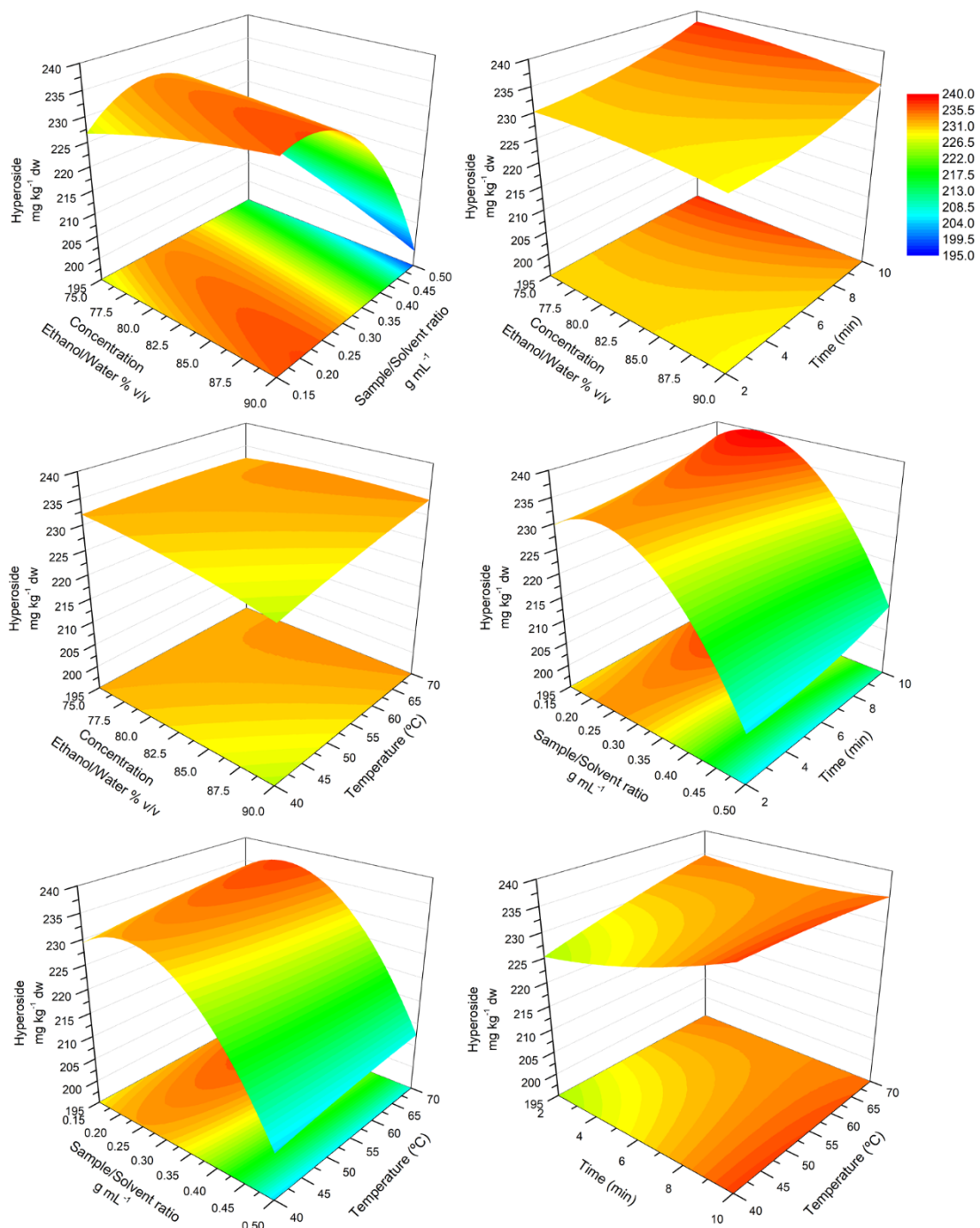


FIGURA 4.16 – Metodologia de superfície de resposta para a extração por EAM de hiperosídeo.

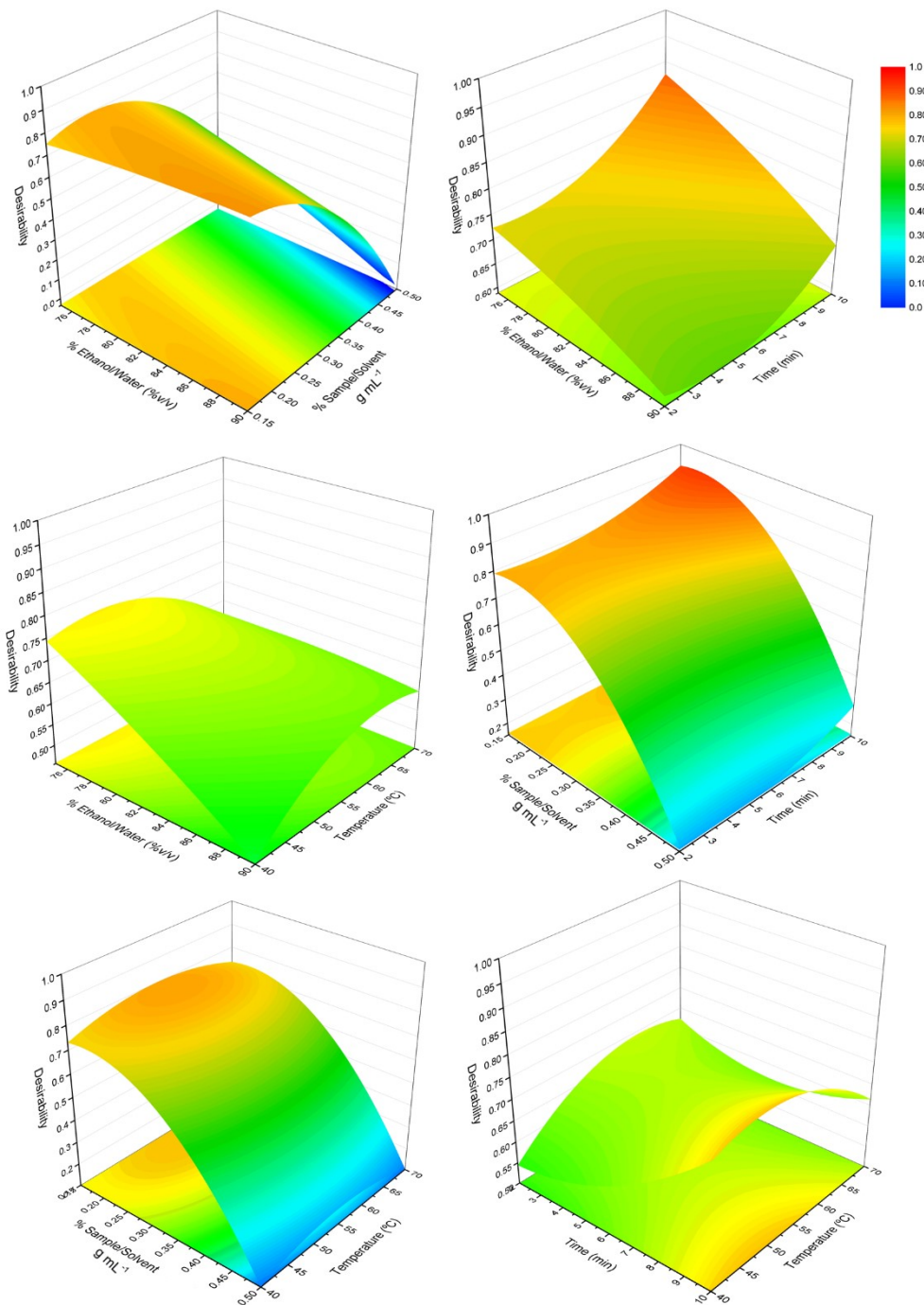


FIGURA 4.17 – Metodologia de superfície de resposta para a extração por EAM de acordo com a função de desejabilidade.

Como é possível observar na Figura 4.17, confirma-se que a razão amostra/solvente se mostrou como a variável que teve maior efeito na eficiência de extração, otimizando as respostas em níveis próximos ao mínimo (primeiro gráfico da coluna da esquerda). Os outros parâmetros tiveram pouco efeito no resultado das extrações, dificultando a avaliação dos níveis ótimos (superfícies planas). Os parâmetros ótimos calculados a partir da equação polinomial da resposta de

desejabilidade foram encontrados em 75,0%_{v/v} de etanol/água, 0,23 g mL⁻¹ de razão amostra/solvente, 10 minutos de extração e 41,1°C. Aplicando estes valores aos modelos individuais dos analitos, obtém-se 266,0 mg kg⁻¹ para a mangiferina e 240,1 mg kg⁻¹ para o hiperosídeo, valores próximos aos encontrados na otimização individual.

As escolhas do modelo de extração com micro-ondas em sistema aberto e níveis máximos de tempo de isoterma de 10 minutos se deram por motivações baseadas na procura por metodologias verdes e sustentáveis, com baixo tempo de extração e evitando temperaturas e pressões altas. A escolha do sistema aberto não permite o uso de temperaturas maiores que 70°C para misturas de água e etanol, para evitar a evaporação destes solventes durante a extração. A composição desta mistura também foi limitada a, no mínimo, 75% de etanol em água, pois maiores proporções de água também provocavam evaporação do solvente devido ao aquecimento dielétrico localizado. Desta forma, é evidente que as limitações impostas por estas escolhas limitaram a avaliação da influência das variáveis na extração dos analitos. É importante destacar que, assim como para qualquer otimização utilizando planejamentos fatoriais, a otimização fica limitada para entre os níveis mínimos e máximos selecionados para cada variável. Ainda assim, é possível afirmar que foram encontradas condições brandas para a extração de mangiferina e hiperosídeo em concentrações comparáveis com as outras técnicas de extração aqui estudadas.

4.1.2.3 – Extração por Dispersão de Matriz em Fase Sólida (DMFS)

A otimização da extração por DMFS foi realizada de acordo com duas variáveis contínuas (razão amostra-sorbente e concentração de etanol em água) e uma variável discreta (tipo de sorbente). Desta forma, dois planejamentos fatoriais do tipo *Doehlert*, planejamento esférico comumente utilizado por sua alta eficiência na observação dos dados com apenas duas variáveis¹⁹², foram realizados (um para cada tipo de sorbente). A análise das respostas dos planejamentos fatoriais (Tabela 4.7) mostrou uma considerável diferença de eficiência de extração nos experimentos entre os dois materiais. As extrações que utilizaram a sílica C18 como fase sólida (experimentos 10-18) obtiveram, em média, respostas 62,6% superiores aos experimentos com o silicato de magnésio Florisil (1 - 9) para a mangiferina e 51,1% superiores para o hiperosídeo. Enquanto as extrações que utilizaram Florisil variaram entre 60,8 e 276,7 mg kg⁻¹ para mangiferina e 74,6 e 289,8 mg kg⁻¹ para hiperosídeo,

C18 demonstrou ser mais eficiente para ambos analitos (mangiferina 249,3 – 352,9 mg kg⁻¹; hiperosídeo 277,36 – 398,52 mg kg⁻¹).

TABELA 4.7 – Planejamento fatorial *Doehlert* duplicado para o método DMFS e as respectivas respostas de mangiferina, hiperosídeo e da função desejabilidade.

Exp.	Amostra-sorbente (X ₁)		Etanol/Água (X ₂)		Sorbente (X ₃)		Respostas		
	Cod.	Real	Cod.	Real	Cod.	Real	Mang.	Hiper.	Desejabilidade
	-	%m/m	-	%v/v	-	min	mg kg ⁻¹		
1	0	62,5	0	62,5	1	Florisil	271,0	289,7	-
2	0	62,5	0	62,5	1	Florisil	258,5	289,8	-
3	0	62,5	0	62,5	1	Florisil	257,2	279,6	-
4	1	100,0	0	62,5	1	Florisil	60,8	74,6	-
5	0,5	81,3	0,866	82,0	1	Florisil	206,1	271,2	-
6	-1	25,0	0	62,5	1	Florisil	184,3	257,3	-
7	-0,5	43,8	-0,866	43,0	1	Florisil	93,5	129,5	-
8	0,5	81,3	-0,866	43,0	1	Florisil	276,7	255,1	-
9	-0,5	43,8	0,866	82,0	1	Florisil	134,7	225,7	-
10	0	62,5	0	62,5	-1	C18	322,0	359,9	0,69
11	0	62,5	0	62,5	-1	C18	326,9	357,0	0,70
12	0	62,5	0	62,5	-1	C18	323,7	360,3	0,70
13	1	100,0	0	62,5	-1	C18	282,5	293,3	0,21
14	0,5	81,3	0,866	82,0	-1	C18	249,3	277,4	0,00
15	-1	25,0	0	62,5	-1	C18	314,1	362,5	0,66
16	-0,5	43,8	-0,866	43,0	-1	C18	352,9	398,5	1,00
17	0,5	81,3	-0,866	43,0	-1	C18	349,0	364,7	0,83
18	-0,5	43,8	0,866	82,0	-1	C18	314,2	357,9	0,65

Na análise dos efeitos das variáveis para ambos sorbentes (Apêndice 1), é possível verificar influências semelhantes dos parâmetros X₁ e X₂ nas respostas de mangiferina, com a concentração de etanol e água (X₂) tendo maior influência negativa, i.e., obtendo maiores respostas em nível mínimo. A variável razão amostra-sorbente (X₁) também obteve valores de efeito negativo para o C18, enquanto para Florisil este valor manteve próximo de zero. Já analisando os efeitos na extração de hiperosídeo, houve uma inversão no efeito da variável X₂ nas extrações utilizando Florisil, com efeito positivo para este sorbente, enquanto negativo para o C18. A variável X₁ manteve efeito negativo na resposta de hiperosídeo para ambas fases sólidas.

Apesar da evidente influência de ambas variáveis, é possível afirmar que o tipo de sorbente (X₃) teve maior efeito nas respostas. Isso se dá, principalmente, pelas dinâmicas de interações entre os analitos, o sorbente e o eluente. Por se tratar de um suporte sólido polar, o Florisil retém compostos de polaridade alta e média

(caso de mangiferina e hiperosídeo), enquanto a sílica modificada com um grupo alquil (C18) tem menos facilidade para reter estes compostos^{90,193}. Desta forma, os compostos-alvo são mais facilmente eluidos pelo solvente e são encontrados em maior concentração nos extratos provenientes da extração com a sílica C18. Alternativamente, se a seletividade da extração destes compostos é priorizada, o suporte sólido Florisil demonstra boa capacidade de retenção para os analitos, podendo incluir uma etapa de *clean-up* com um solvente apolar prévia à eluição com a mistura etanólica, como foi demonstrado por Monasterio *et. al.* (2014)⁹².

Para melhor avaliação das outras variáveis que influenciam na extração, foi realizado o cálculo do modelo polinomial de segunda ordem apenas nos ensaios realizados com a sílica C18. O cálculo destes modelos demonstrou valores satisfatórios de coeficientes de determinação ($R^2 > 0,97$) e p-valores aceitáveis para a regressão, porém demonstrando significância estatística na falta de ajuste do modelo (tabela ANOVA, Apêndice 2). Os modelos foram então plotados em superfícies de resposta, que podem ser vistas na Figura 4.18.

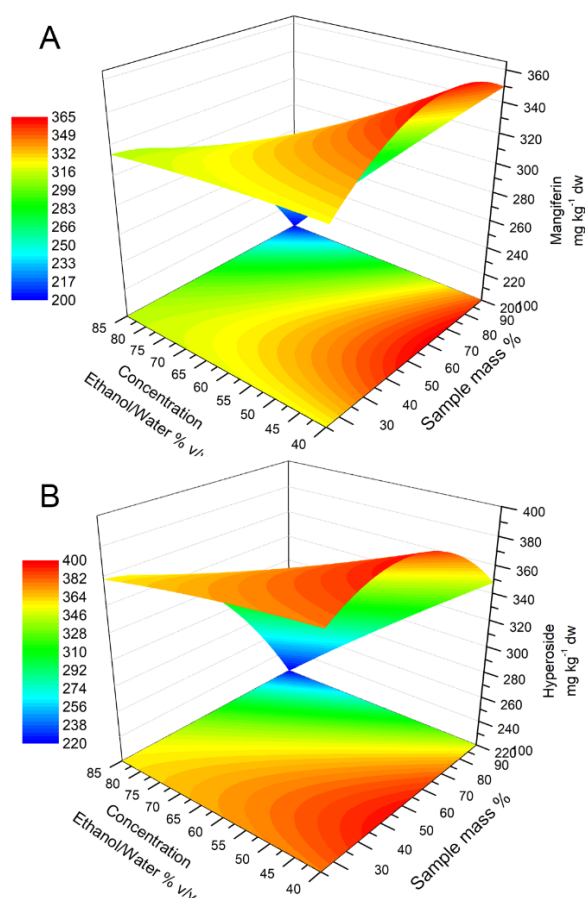


FIGURA 4.18 – Metodologia de superfície de resposta para a extração por DMFS de acordo com as respostas de mangiferina (A) e hiperosídeo (B).

As superfícies de resposta evidenciam as tendências previamente observadas, com valores ótimos de extração encontrados de 364,0 mg kg⁻¹ para mangiferina ($X_1=72,1\%_{m/m}$; $X_2=40,0\%_{v/v}$) e 395,6 mg kg⁻¹ para hiperosídeo ($X_1=53,4\%_{m/m}$; $X_2=40,0\%_{v/v}$). Diferente dos outros métodos de extração, a obtenção de respostas ótimas em valores inferiores de concentração de etanol em água demonstra as diferentes interações solvente-soluto-matriz-sorbente presentes na técnica de DMFS. Por se valer de uma coluna cromatográfica com pressão positiva e matriz dispersa ao longo da coluna, diversas interações complexas são observadas e dificultam a predição da eficiência da extração a partir das condições de polaridade do solvente¹⁹⁴. Logo, os menores volumes de etanol encontrados que otimizam a extração podem ser vistos como positivos, haja vista os impactos ambientais causados pelo etanol, por mais que sejam menores em relação a outros solventes orgânicos.

Na Figura 4.18 é possível observar certa discrepância entre os pontos de maior resposta de mangiferina e hiperosídeo em termos da proporção amostra-sorbente. Desta forma, se fez necessário o cálculo da função de desejabilidade para obtenção de parâmetros que possam otimizar a resposta de ambos analitos simultaneamente. Apesar de não demonstrarem bons parâmetros estatísticos na análise de variância (Apêndice 2), os dados de desejabilidade para cada experimento (Tabela 4.7) foram modelados em uma superfície de resposta para avaliação da tendência das variáveis (Figura 4.19). Os parâmetros que induzem uma máxima resposta de desejabilidade foram calculados em 56,9 %_{m/m} de amostra-sorbente e 41,3 %_{v/v} de etanol em água, que ao serem aplicados nos modelos individuais geram uma resposta de 357,9 mg kg⁻¹ de mangiferina e 393,7 mg kg⁻¹ de hiperosídeo.

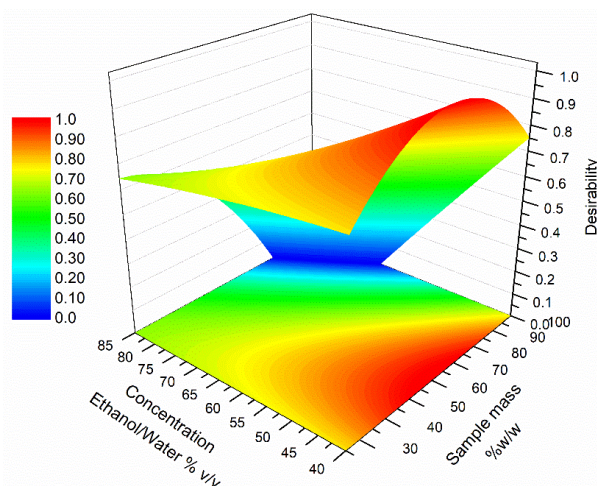


FIGURA 4.19 – Metodologia de superfície de resposta para a extração por DMFS de acordo com as respostas da função de desejabilidade.

Os valores encontrados para a variável X_1 demonstram a necessidade de uma alta proporção de sorbente para amostra (aproximadamente 2:1). Por mais que este valor seja considerado aceitável para fins analíticos em metodologias laboratoriais, ao aumentar a escala de extração para níveis piloto e industrial, o uso de sílica modificada se torna pouco prático, levando-se em consideração que dificilmente os sorbentes utilizados em DMFS conseguem ser recuperados⁹⁵. Extrapolando a eficiência de extração em escalas maiores, por exemplo, para extração do equivalente de 1 g de mangiferina, são necessários 2,8 kg de resíduo de manga e 4,9 kg de sílica C18, cujo preço varia entre US\$3.000 – US\$10.000 por quilograma¹⁹⁵. Infelizmente, poucas informações podem ser encontradas sobre os impactos ambientais de fases estacionárias tipicamente utilizadas em DMFS. Porém, especialmente em fases modificadas, diversas etapas de síntese são necessárias para sua produção, o que pode indicar um impacto maior na produção destes materiais, ainda sem levar em consideração sua destinação final. Por outro lado, fases estacionárias mais simples podem ser utilizadas para extrações DMFS, como a areia^{196,197}, alguns tipos de rocha¹⁹⁸ e até cascas de moluscos¹⁹⁹. Isto pode ser especialmente eficiente para quando a seletividade não é o fator mais esperado desta extração, priorizando os fatores mecânicos de quebra das células das plantas e a interação da matriz com a fase sólida para a promoção de uma melhor eficiência de extração. Por outro lado, a maior eficiência de extração, em comparação com as outras técnicas, mostrou que a DMFS pode ser utilizada efetivamente em

metodologias analíticas para detecção de compostos bioativos a partir de matrizes vegetais.

Outro fator desvantajoso deste método é o alto tempo de eluição, que ultrapassou 30 minutos para cada extração. Isto se deu devido ao tamanho de partícula da matriz e do sorbente utilizado, em especial para o C18. Por fim, a maceração, etapa que foi feita manualmente com o auxílio de pistilo e almofariz, pode ser realizada por meio de técnicas automatizadas de mistura para também viabilizar o escalonamento da DMFS, como o uso de moinho de bolas²⁰⁰.

4.1.2.4 – Extração Assistida por Homogeneizador em soluções de líquidos iônicos (EAH-LIs)

a) Triagem dos líquidos iônicos

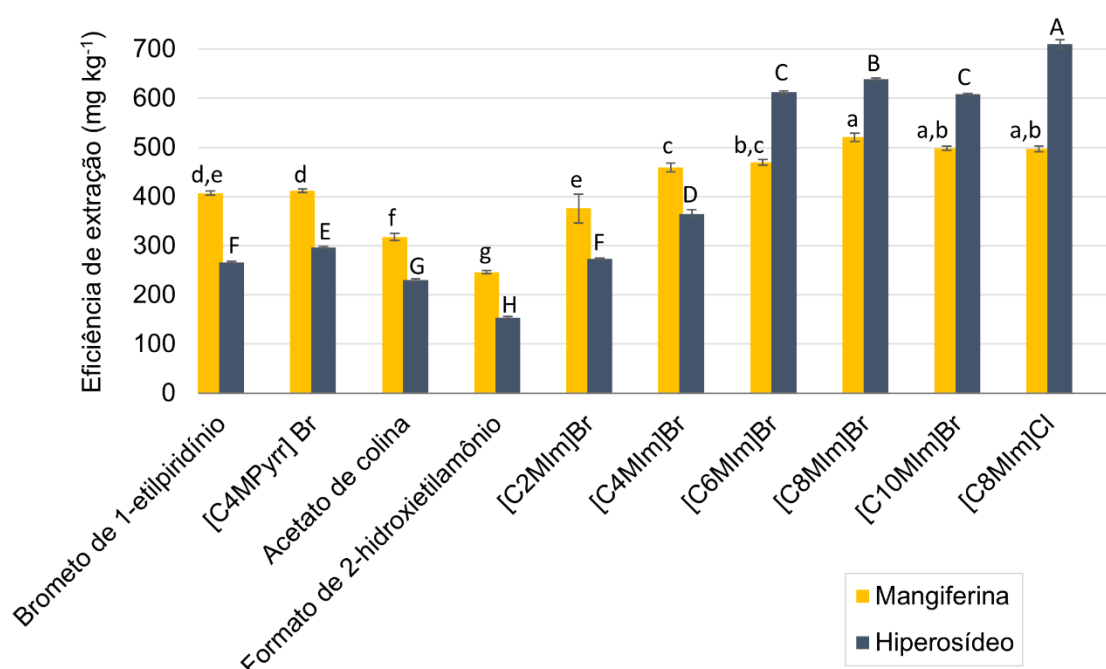


FIGURA 4.20 – Resultado do ensaio de triagem dos líquidos iônicos (EAH-LIs) para a extração de mangiferina e hiperosídeo a partir de resíduo de processamento de manga. As barras de erro estão em termos do desvio padrão das triplicatas e as letras representam as diferenças estatísticas das médias de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$) para mangiferina (letras minúsculas) e hiperosídeo (letras maiúsculas).

Soluções aquosas dos líquidos iônicos selecionados foram testadas como solventes para a extração de mangiferina e hiperosídeo de resíduos de manga utilizando o método de EAH com parâmetros fixos (Figura 4.20). A maioria dos LIs obteve boa eficiência de extração, se destacando os tradicionalmente utilizados

cátions derivados de 1-alkil-3-metilimidazólio ($C_{2-10}MIm$), sendo de melhor eficiência de extração os com cadeia de oito carbonos (C_8), com ânion cloro ou bromo. Neste ensaio, fica evidente o efeito do prolongamento da cadeia alquílica no aumento da eficiência de extração com cátions de imidazólio, chegando em eficiência máxima em oito carbonos. É interessante também observar a inversão do composto majoritário entre os marcadores de referência na extração com os cátions de imidazólio com cadeia alquílica a partir de 6 carbonos, que passam a obter maiores concentrações do hiperosídeo, possivelmente por ser menos polar, em relação à mangiferina.

O composto que obteve melhor eficiência de extração para a soma dos dois analitos ($[C_8MIm] Cl$) e o único LI considerado biodegradável entre os selecionados (acetato de colina) foram selecionados para a próxima etapa de otimização, onde os parâmetros de extração foram avaliados.

b) Otimização da extração por EAH-LIs utilizando $[C_8MIm] Cl$ e acetato de colina

Para a otimização, foi realizado um planejamento do tipo *Box-Behnken*, cujos experimentos, suas variáveis e as respectivas respostas dos marcadores de referência para ambos LIs podem ser vistos na Tabela 4.8. Há um aumento da eficiência de extração máxima encontrada em comparação com os testes realizados com estes LIs na etapa de triagem, evidenciado pelo maior efeito da variável X_1 (concentração do LI). A partir da análise dos efeitos das variáveis (Apêndice 1), é possível também observar que as outras variáveis foram pouco influentes nas respostas de mangiferina e hiperosídeo. Para melhor avaliação dos parâmetros, os dados de resposta obtidos foram então ajustados nos modelos polinomiais para gerar superfícies de respostas, que podem ser vistas nas Figura 4.21 e Figura 4.22 para $[C_8MIm] Cl$ e acetato de colina, respectivamente.

A análise de variância dos modelos polinomiais (Apêndice 2) demonstrou valores de coeficiente de determinação satisfatórios ($R^2 > 0,99$) para todas as regressões, porém foi observada falta de ajuste em relação ao erro puro ($p < 0,05$) em todos os modelos, exceto o de mangiferina utilizando o LI imidazólico. Apesar disso, o teste estatístico da média quadrática da regressão em relação à dos resíduos foi aceitável para todas os modelos.

Os valores ótimos calculados a partir dos modelos polinomiais foram, para a extração com [C₈MIm] Cl: X₁=2,0 mol L⁻¹, X₂=5,0 min, X₃=0,15 g mL⁻¹ para a mangiferina (811,9 mg kg⁻¹); X₁=1.9 mol L⁻¹, X₂=28.4 min, X₃=0.15 g mL⁻¹ para o hiperosídeo (944.79 mg kg⁻¹). Já para as extrações em acetato de colina, obteve-se concentração máxima de mangiferina em 448,5 mg kg⁻¹ (X₁=2,0 mol L⁻¹, X₂=30,0 min, X₃=0,15 g mL⁻¹) e de hiperosídeo em 379,6 mg kg⁻¹ (X₁=2,0 mol L⁻¹, X₂=30,0 min, X₃=0,05 g mL⁻¹). Tendências semelhantes podem ser vistas na influência das variáveis dos dois diferentes LIs testados, onde a concentração do solvente foi determinante para melhores eficiências de extração em valores próximos do nível máximo (2 mol L⁻¹). Já para a variável tempo de extração (X₂), a pouca influência nas respostas pode ser observada na variação do nível máximo entre os analitos e os LIs, bem como nas superfícies de resposta, que em todos os casos demonstraram pouca curvatura paralela ao eixo desta variável. O mesmo ocorreu para a razão amostra-solvente, ainda que seja possível observar ligeira tendência de crescimento em valores próximos de 0,15 g mL⁻¹, especialmente para o [C₈MIm] Cl (Figura 4.21).

TABELA 4.8 – Planejamento fatorial *Box-Behnken* utilizando o método EAH-LIs e as respectivas respostas de mangiferina e hiperosídeo para os LIs [C₈MIm] Cl e acetato de colina.

Exp.	Variáveis						Respostas			
	Conc. do LI (X ₁)		Tempo (X ₂)		Amostra-solvente (X ₃)		[C ₈ MIm] Cl		Acetato de Colina	
	Cod.	Real	Cod.	Real	Cod.	Real	Mang.	Hiper.	Mang.	Hiper.
	-	mol L ⁻¹	-	min	-	g mL ⁻¹	mg kg ⁻¹			
1	0	1,1	0	17,5	0	0,10	503,7	737,9	300,5	154,8
2	0	1,1	0	17,5	0	0,10	511,8	734,4	297,8	152,1
3	0	1,1	0	17,5	0	0,10	513,7	737,8	297,6	152,2
4	-1	0,2	-1	5,0	0	0,10	279,2	115,3	174,7	29,2
5	-1	0,2	1	30,0	0	0,10	299,0	132,0	153,7	31,7
6	1	2,0	-1	5,0	0	0,10	726,9	811,2	414,8	303,6
7	1	2,0	1	30,0	0	0,10	732,6	882,4	415,8	352,7
8	-1	0,2	0	17,5	-1	0,05	340,0	170,8	189,9	18,4
9	-1	0,2	0	17,5	1	0,15	237,4	86,6	141,6	29,0
10	1	2,0	0	17,5	-1	0,05	632,1	835,9	378,1	383,8
11	1	2,0	0	17,5	1	0,15	787,7	915,5	422,9	346,6
12	0	1,1	-1	5,0	-1	0,05	433,1	656,4	371,8	202,3
13	0	1,1	-1	5,0	1	0,15	527,8	696,3	306,3	150,3
14	0	1,1	1	30,0	-1	0,05	524,9	695,3	335,4	164,0
15	0	1,1	1	30,0	1	0,15	527,4	763,8	316,5	159,5

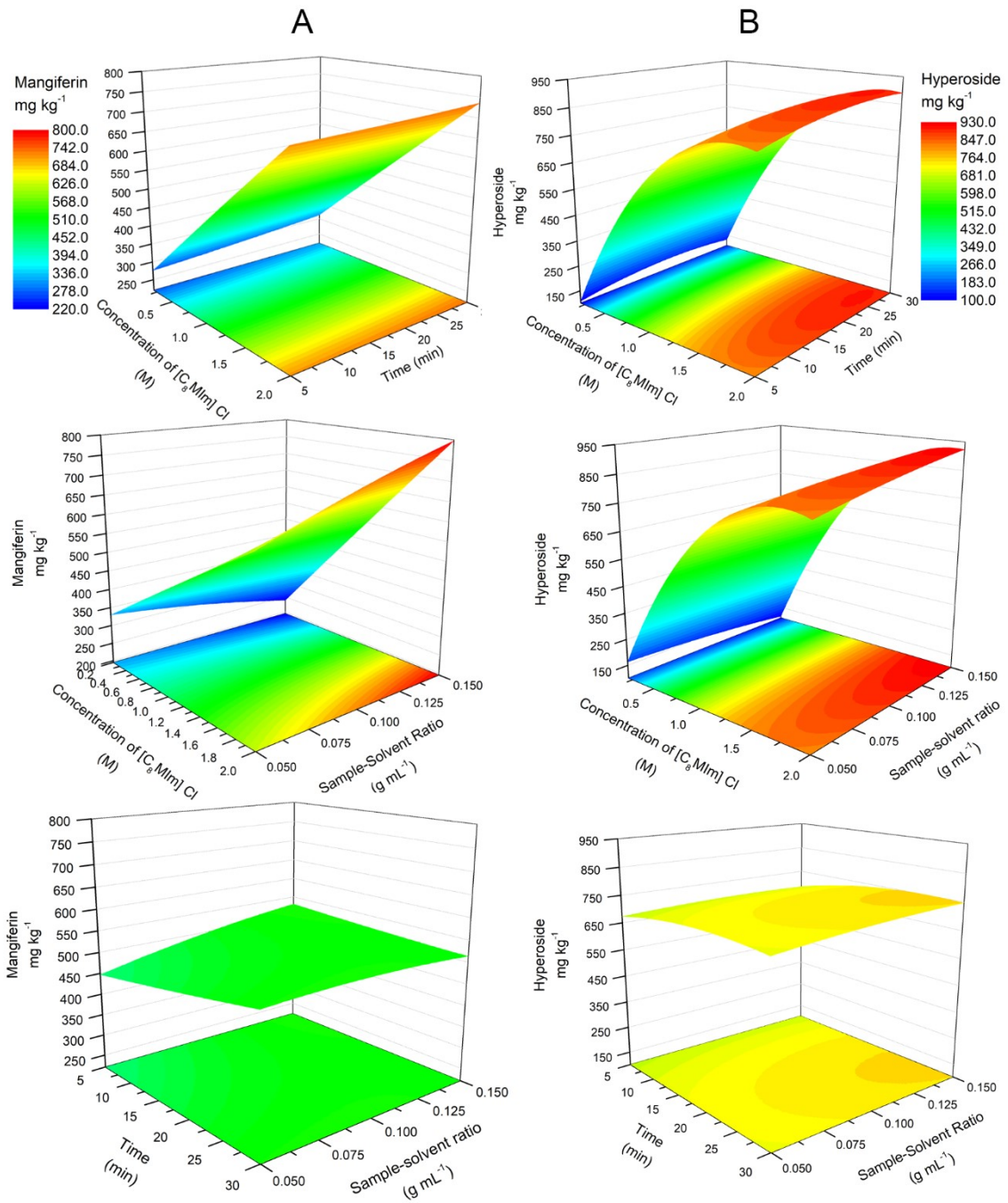


FIGURA 4.21 – Metodologia de superfície de resposta para o método EAH-LIs para as extrações de mangiferina (coluna A) e hiperosídeo (coluna B) utilizando o LI [C₈MIm] Cl como solvente.

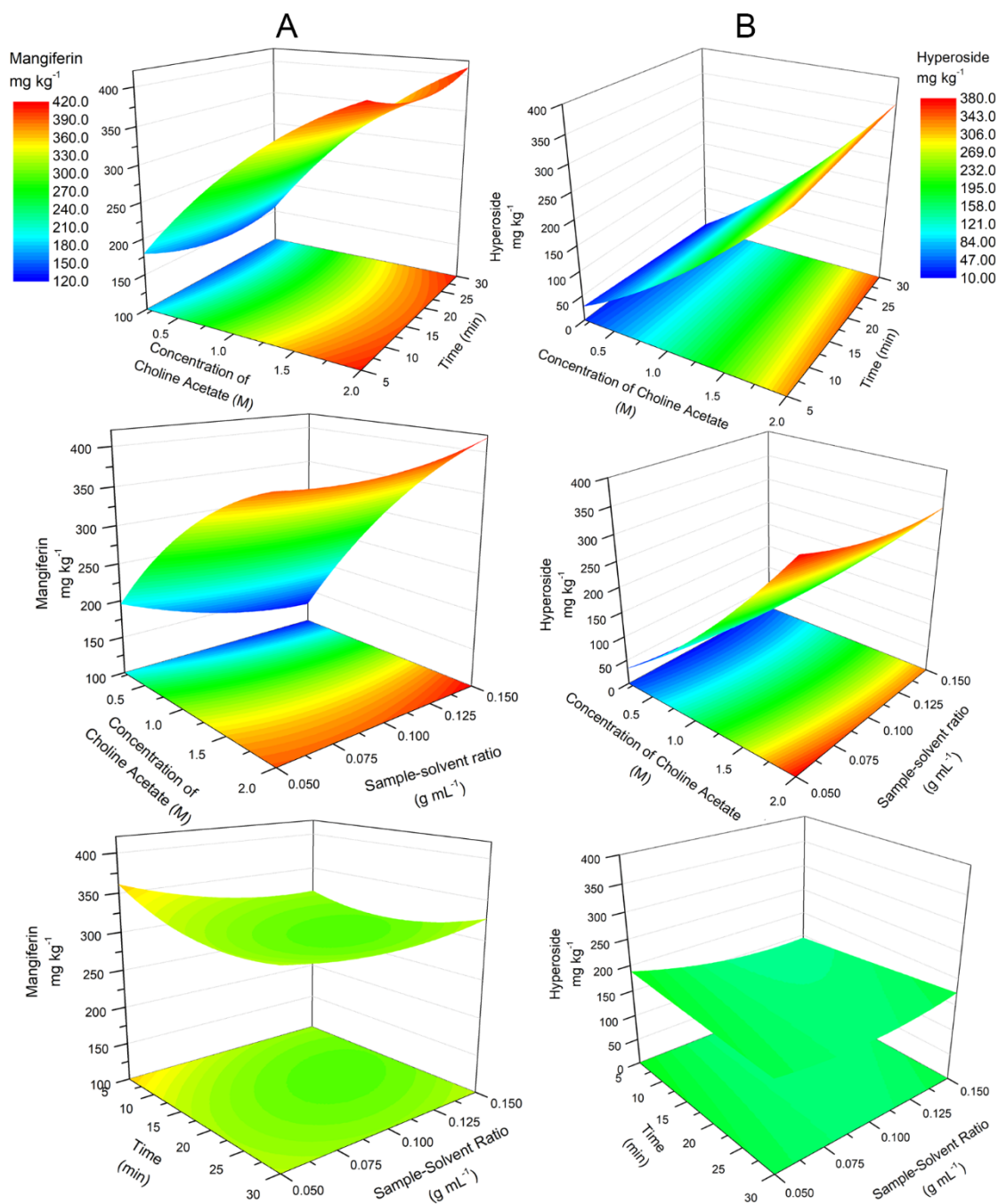


FIGURA 4.22 – Metodologia de superfície de resposta para o método EAH-LIs para as extrações de mangiferina (coluna A) e hiperosídeo (coluna B) utilizando o LI acetato de colina como solvente.

O nível máximo selecionado para a razão amostra-solvente ($0,15 \text{ g mL}^{-1}$) otimiza a extração, o que pode ter dificultado a avaliação desta variável. Porém, este nível máximo foi escolhido devido à maior viscosidade das soluções aquosas dos LIs, que têm limitações com a técnica de EAH quando em maiores proporções de amostra e altas concentrações dos LIs. Também por conta desta limitação, maiores tempos de extração foram testados em comparação com os ensaios anteriores desta técnica em etanol (EAH-EtOH), para assegurar completa

homogeneidade da mistura sólido-líquido altamente viscosa formada em alguns dos experimentos. O uso de um equipamento maior e mais robusto, em comparação com o anterior, permitiu o uso de maiores tempos de extração, ainda que necessário aguardar um tempo maior entre extrações para resfriamento do equipamento. Entretanto, exceto no caso da resposta de hiperosídeo utilizando o [C₈MIm] Cl (Figura 4.21), o tempo de extração não se mostrou uma variável significativa para esta extração, podendo então adotar-se tempos menores e manter altas eficiências de extração.

A maior influência da concentração do líquido iônico evidencia o papel da afinidade solvente-soluto nesta extração, demonstrando haver uma maior influência da solubilidade na eficiência de extração em relação a outras propriedades físico-químicas, especialmente a viscosidade. Esta, que em maiores valores pode influenciar negativamente as extrações sólido-líquido⁵⁹, é diretamente proporcional à concentração do LI em água²⁰¹ e ao tamanho da cadeia alquílica em LIs imidazólicos²⁰². Logo, ainda que a viscosidade seja maior em altas concentrações de [C₈MIm] Cl, a maior solubilidade teve um papel prioritário na extração de mangiferina e hiperosídeo em amostras de resíduo de manga.

Para efeitos de comparação, foram realizadas extrações utilizando os parâmetros ótimos obtidos no método EAH-EtOH, porém se valendo da metodologia analítica e dos equipamentos utilizados no método dos líquidos iônicos. Como pode ser visualizado na Figura 4.23, o experimento 11 do planejamento fatorial realizado com [C₈MIm] Cl em água se mostrou, em média, 57% mais eficiente na extração de mangiferina e hiperosídeo em relação aos melhores experimentos com aceto de colina e 22% em relação ao etanol em água. A mistura etanólica também demonstrou ser superior à extração com acetato de colina (45%, em média). Comparando as eficiências de extração com soluções aquosas de etanol e [C₈MIm] Cl, conclui-se que, apesar da menor eficiência de extração, as soluções etanólicas demonstram suficiência na extração de mangiferina e hiperosídeo a partir de resíduos de manga ao levar em consideração fatores relacionados aos possíveis impactos ambientais dos diferentes solventes. Particularmente os cátions de imidazólio, ligados à altas toxicidades²⁰³ e média-baixa biodegradabilidade²⁰⁴, além de difícil recuperação – apesar de possível²⁰⁵ –, podem causar problemas diversos nas esferas ambientais e sociais. Por outro lado, é interessante observar a maior eficiência de extração obtida

pela maioria dos LIs, visto que novas gerações destes compostos vêm sendo desenvolvidas e, caso ganhem escala de produção, podem ser alternativas eficientes e sustentáveis para a extração de bioativos a partir de matrizes vegetais⁶⁹.

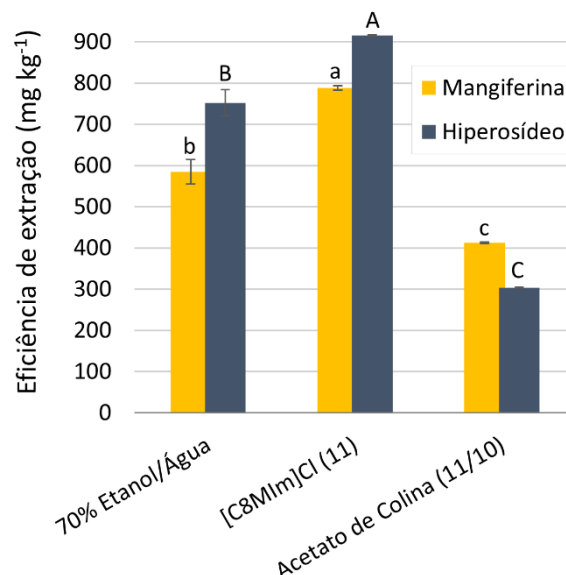


FIGURA 4.23 – Comparação entre melhores experimentos de extração com o método EAH e suas eficiências de extração de mangiferina e hiperosídeo. As barras de erro estão em termos do desvio padrão das triplicatas e as letras representam as diferenças estatísticas das médias de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$) para mangiferina (letras minúsculas) e hiperosídeo (letras maiúsculas).

4.1.3 – Comparação entre diferentes métodos de secagem

Utilizando o método EAH-EtOH, foram comparadas as eficiências de extração dos marcadores de referência para uma mesma amostra (RPM/LC) sob diferentes técnicas de secagem (estufa e liofilização). As respostas podem ser vistas na Figura 4.24. É possível observar uma diferença significativa na eficiência de extração de mangiferina, que foi superior na amostra seca em estufa, e do hiperosídeo, que foi maior na amostra liofilizada. A soma das concentrações do par de analitos foi praticamente a mesma na amostra da estufa (637,0 mg kg⁻¹) em comparação com a do liofilizador (630,8 mg kg⁻¹), sem diferença estatística ($p < 0,05$). A análise dos cromatogramas dos dois diferentes extratos a partir da corrida exploratória (Figura 4.25) mostrou perfis químicos semelhantes nos diferentes comprimentos de onda, com ligeira diferença na intensidade de algumas bandas, particularmente a banda não identificada presente em 12,2 minutos (254 e 350 nm).

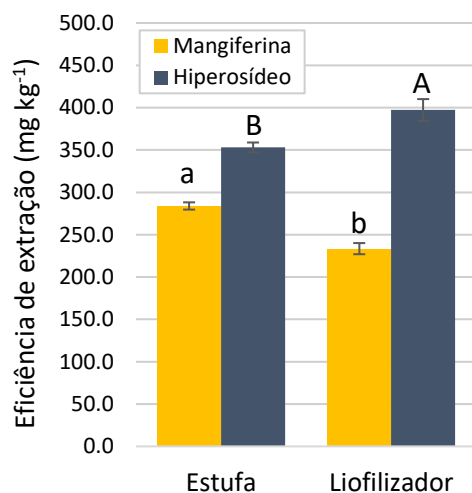


FIGURA 4.24 – Resultados de eficiência de extração de mangiferina e hiperosídeo a partir da amostra de resíduo de manga (RPM/LC) seca em estufa e liofilizador. As barras de erro representam o desvio padrão das triplicatas e as letras mostram as diferenças estatísticas das médias de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$) para mangiferina (letras minúsculas) e hiperosídeo (letras maiúsculas).

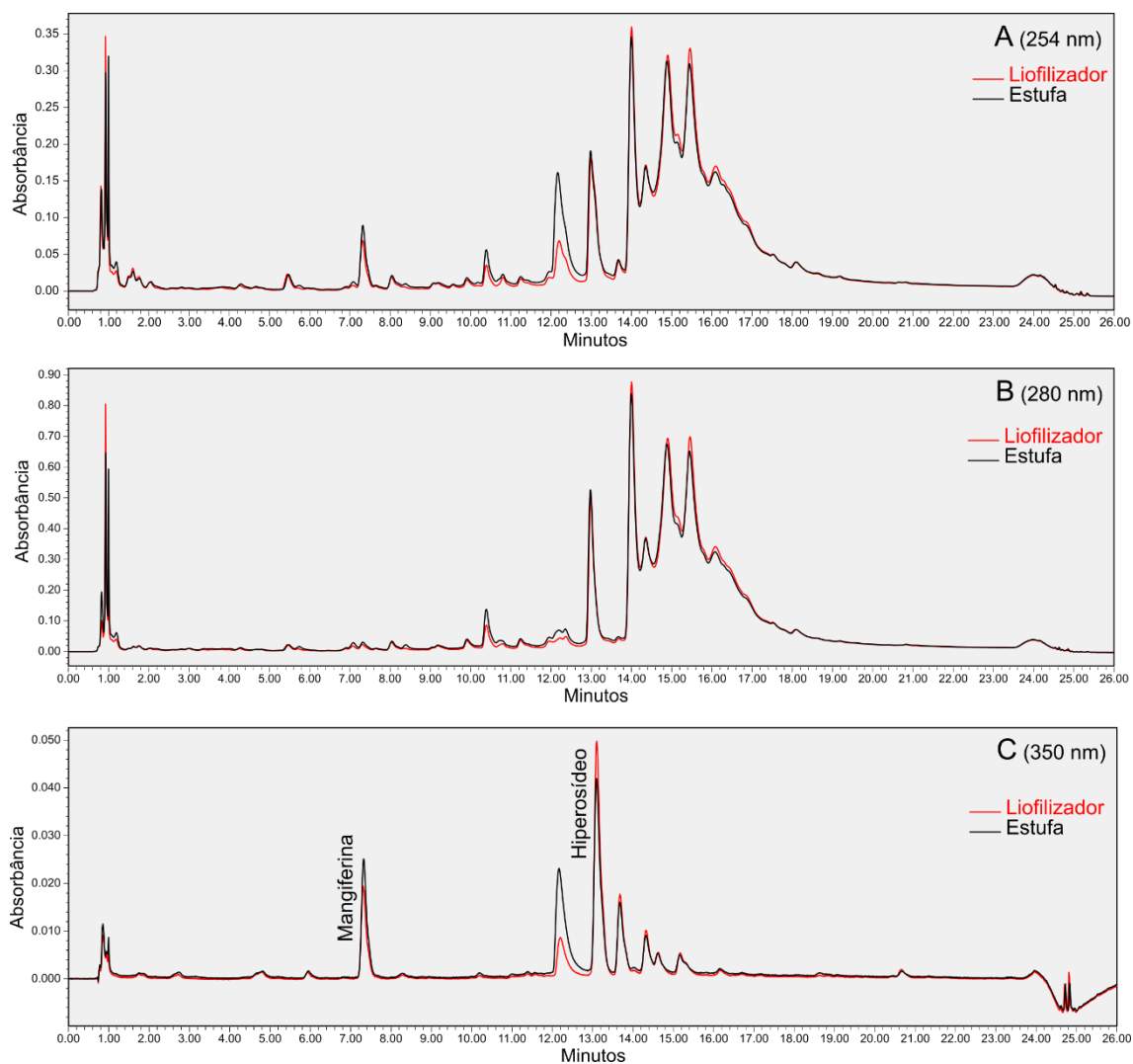


FIGURA 4.25 – Cromatogramas exploratórios das amostras de resíduo de manga obtidas a partir de secagem com estufa (preto) e com liofilizador (vermelho), registrados em comprimentos de onda de 254 (A), 280 (B) e 350 nm (C).

4.1.4 – Comparação entre diferentes amostras

Utilizando os mesmos parâmetros do ensaio anterior, foram comparadas as eficiências de extração dos marcadores de referência nas diferentes amostras de resíduo de manga, todas obtidas por secagem em estufa. Observa-se uma maior eficiência de extração de hiperosídeo nas amostras processadas no laboratório em comparação com a amostra proveniente do processamento industrial, enquanto o inverso foi identificado para a mangiferina (Figura 4.26). Vale ressaltar que as amostras foram obtidas a partir de frutas provenientes de origens variadas e que passaram por condições diferentes. Diversas variáveis podem afetar a quantidade dos analitos nas frações residuárias, bem como seu perfil químico, cujos efeitos não foram avaliados no escopo deste trabalho. Analisando a soma das concentrações dos dois analitos, todas as amostras tiveram valores estatisticamente iguais ($p < 0,05$). O perfil químico das amostras obtidas em laboratório foi semelhante em 350 nm, com a presença de uma banda não identificada de alta intensidade em 12 min, que apareceu em menor intensidade na amostra RPM/IO (Figura 4.27). Nos outros comprimentos de onda, o perfil químico se mostrou mais intenso nas amostras RPM/LC e RPM/IO, nesta ordem, particularmente em tempos de retenção acima de 13 min.

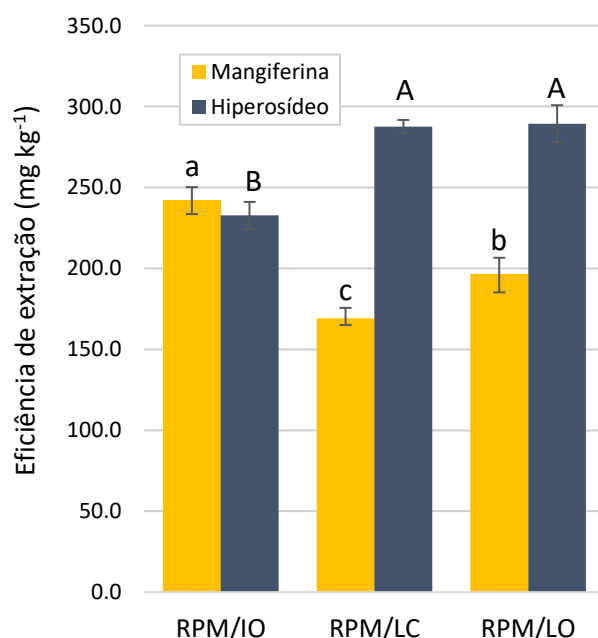


FIGURA 4.26 – Resultados comparativos da eficiência de extração de mangiferina e hiperosídeo a partir das diferentes amostras de resíduo de manga: processamento industrial de manga orgânica (RPM/IO), processamento laboratorial de manga convencional (RPM/LC) e orgânica (RPM/LO). As barras de erro representam o desvio padrão das triplicatas e as letras mostram as diferenças estatísticas das médias de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$) para mangiferina (letras minúsculas) e hiperosídeo (letras maiúsculas).

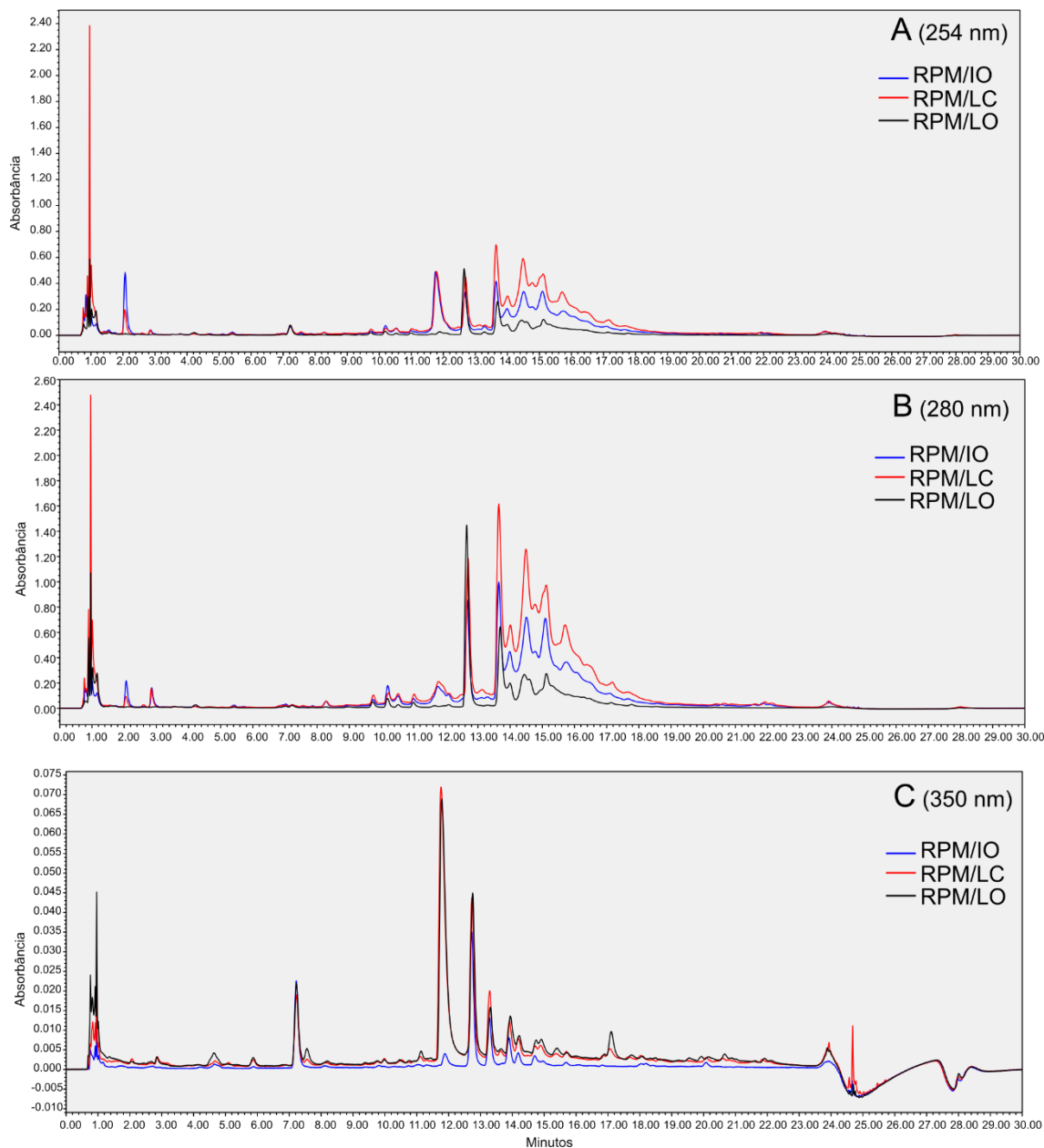


FIGURA 4.27 – Cromatogramas exploratórios das diferentes amostras de resíduo de manga (*Mangifera indica* var. Palmer) obtidas a partir de processamento industrial de manga orgânica (RPM/IO - azul), processamento laboratorial de manga convencional (RPM/LC - vermelho) e orgânica (RPM/LO - preto) nos comprimentos de onda de 254 (A), 280 (B) e 350 nm (C).

Nos termos realizados nesta metodologia, os resultados obtidos não corroboraram com a hipótese de que há maior presença de compostos bioativos em frutas provenientes de prática orgânica de agricultura. As amostras obtidas comercialmente a partir da fruta *in natura* tiveram diferença estatística insignificante nas concentrações de mangiferina e hiperosídeo, além perfil químico semelhante.

4.2 – Goiaba (*Psidium guajava*)

4.2.1 – Métodos cromatográficos, curvas analíticas e figuras de mérito

4.2.1.1 – Extração Assistida por Homogeneizador em soluções etanólicas ácidas (EAH-HCl)

Um método cromatográfico para detecção e quantificação de quercetina e vanilina como marcadores de referência em extratos de goiaba foi desenvolvido em sistema cromatográfico de HPLC. Por esta parte do trabalho ter sido desenvolvida em período de estágio no exterior, este método foi apenas utilizado nos ensaios preliminares com a técnica de extração por homogeneizador para avaliação da viabilidade das extrações com presença de ácido clorídrico. Logo, não foram realizadas as avaliações completas das figuras de mérito, que serão melhor desenvolvidas no método descrito na próxima seção (Item 4.2.1.2).

Desta forma, foram realizadas as curvas de calibração para quantificação de quercetina e vanilina em extratos de goiaba (Tabela 4.9). Os parâmetros de linearidade e LDs e LQs se mostraram aceitáveis. É possível observar que os limites de detecção e quantificação desta metodologia são significativamente menores em comparação com os métodos analíticos para as amostras de manga. Isto se dá pela maior capacidade da quercetina e vanilina de absorverem a radiação ultravioleta, mas principalmente pelo maior volume de injeção utilizado nesta análise (2 µL), necessário para a detecção destes compostos nos extratos, que estão em concentrações menores em comparação aos detectados nos extratos de manga.

TABELA 4.9 – Equações das curvas analíticas, coeficiente de determinação e limites de detecção e de quantificação utilizados para os experimentos EAH-HCl.

Composto	Equação	R ²	LD	LQ
			mg L ⁻¹	
Quercetina	$y = 44147,53x - 2424,98$	0,9996	0,26	0,86
Vanilina	$y = 53527,92x - 3477,08$	0,9996	0,25	0,84

4.2.1.2 – Extração Assistida por Ultrassom em soluções ácidas (EAU-HCl) e demais análises

Este método analítico, desenvolvido em equipamento de UHPLC, foi utilizado para as extrações empregando a técnica por ultrassom e demais análises comparativas. Os cromatogramas comparativos entre a solução de padrão analítico e

o extrato proveniente do método EAU-HCl podem ser visualizados na Figura 4.28. A vanilina, detectada em 280 nm, teve o tempo de retenção em torno de 4 min, enquanto a quercetina (370 nm), foi identificada em 14,5 min da corrida cromatográfica.

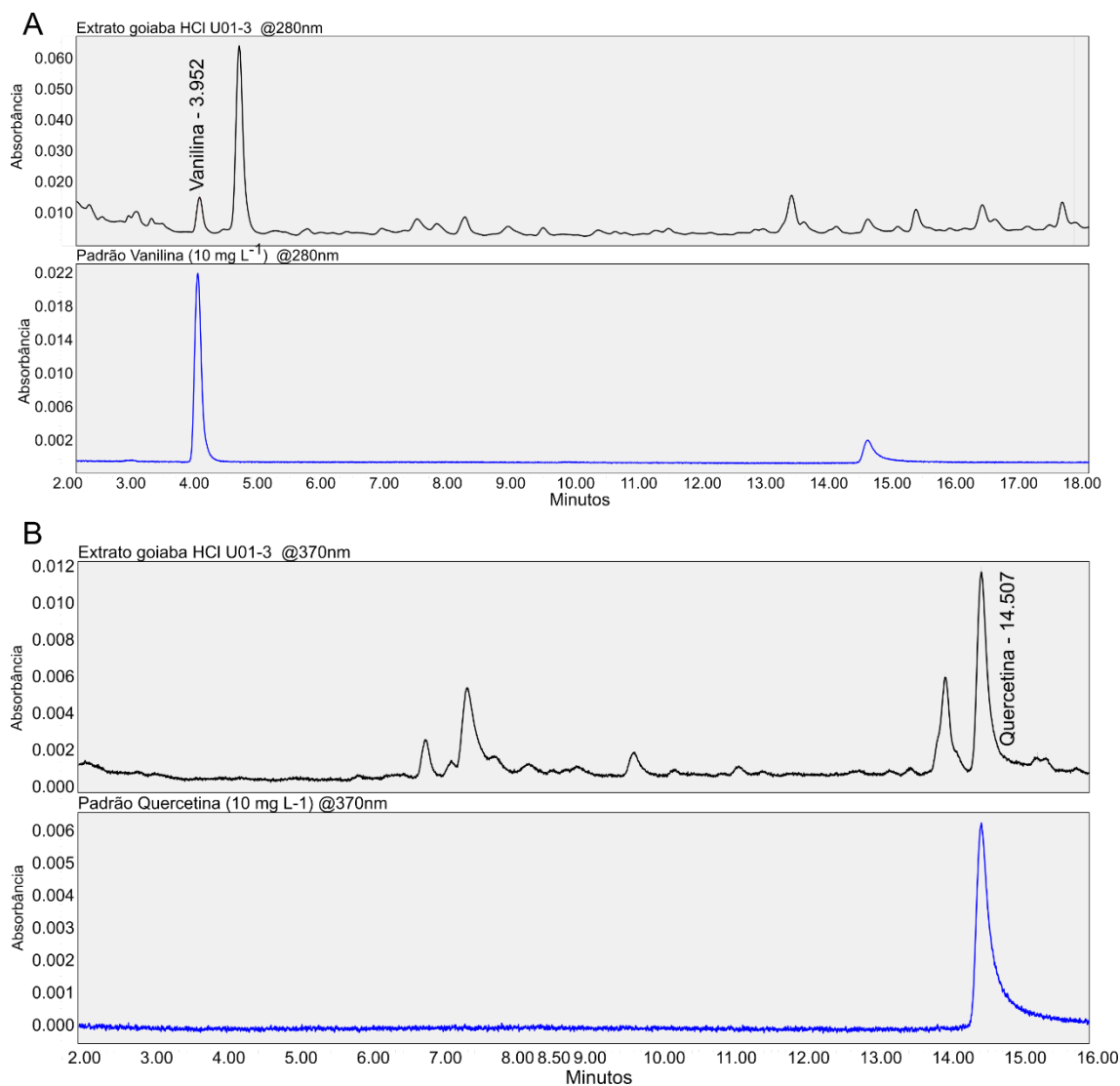


FIGURA 4.28 – Cromatogramas da solução padrão de quercetina e vanilina (azul) e extratos provenientes de extração EAU-HCl (preto), registrados em 280 (A) e 370 nm (B).

Assim como nos outros métodos, para avaliação da seletividade desta metodologia foram realizados cromatogramas comparativos entre extratos de resíduo de goiaba e as mesmas soluções fortificadas com os padrões analíticos (Figura 4.29), identificando as bandas investigadas ao observar o aumento de suas áreas. Além disso, também foram comparados os perfis UV das bandas investigadas, tanto entre corridas com extratos e padrões (Figura 4.30), como entre diferentes pontos das

bandas para avaliação de sua pureza (Figura 4.31). Pôde-se observar que as bandas investigadas no extrato de goiaba têm perfil de absorção UV semelhante ao observado nos padrões, bem como verificar pouca variação deste perfil em diferentes tempos de retenção relacionados à banda cromatográfica.

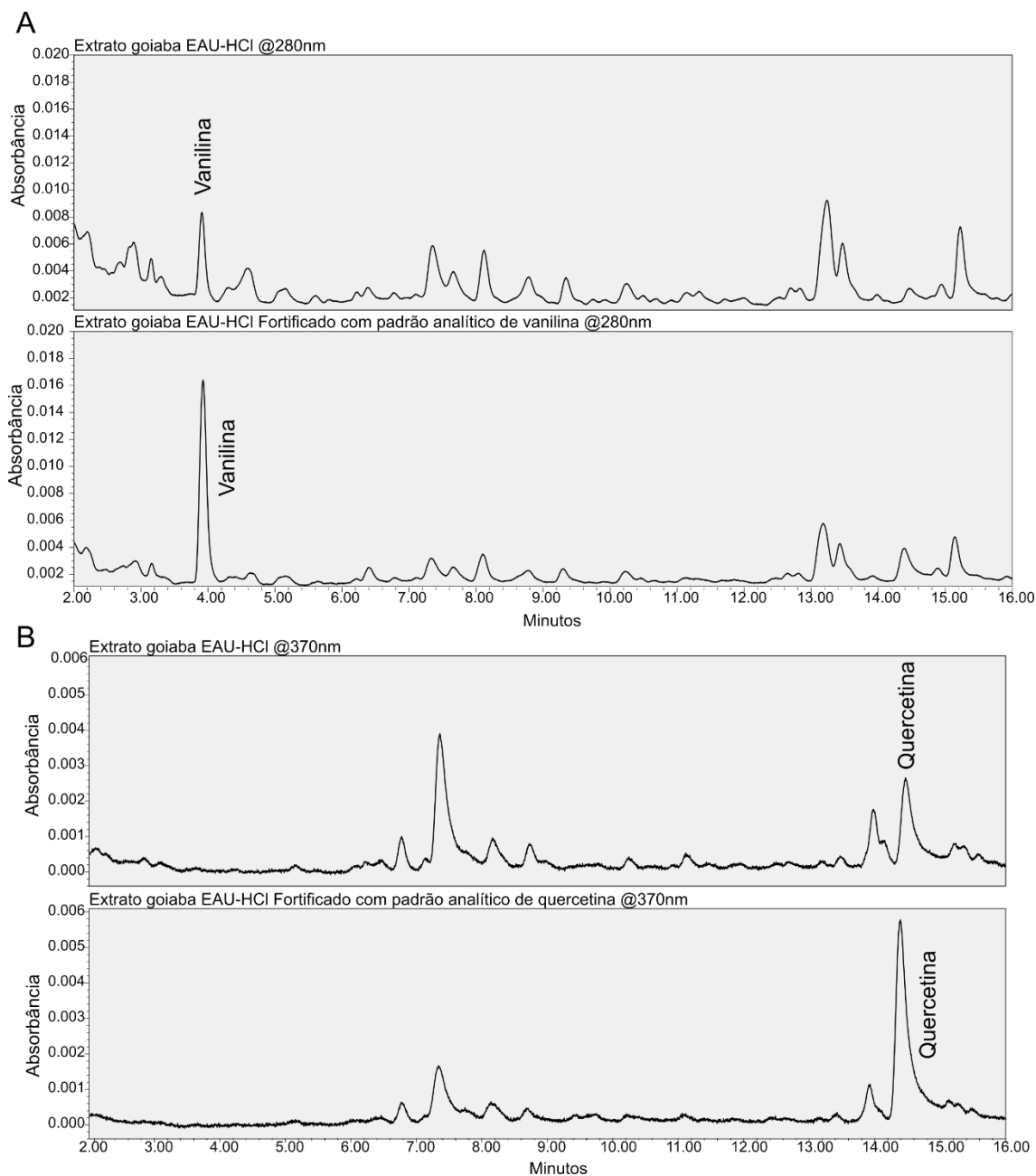


FIGURA 4.29 – Comparação de cromatogramas de extrato de goiaba obtidos a partir do método EAU-HCl e o mesmo extrato fortificado com vanilina detectado a 280 nm (A) e quercetina detectado em 370 nm (B).

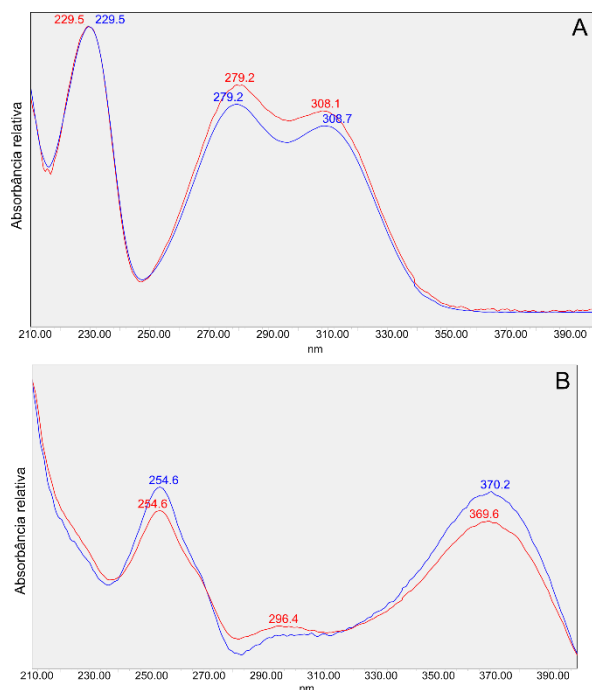


FIGURA 4.30 – Perfil UV das bandas cromatográficas de vanilina (A) e quercetina (B) encontradas em solução padrão de 100 mg L⁻¹ (vermelho) e no extrato obtido pelo método EAU-HCl (azul).

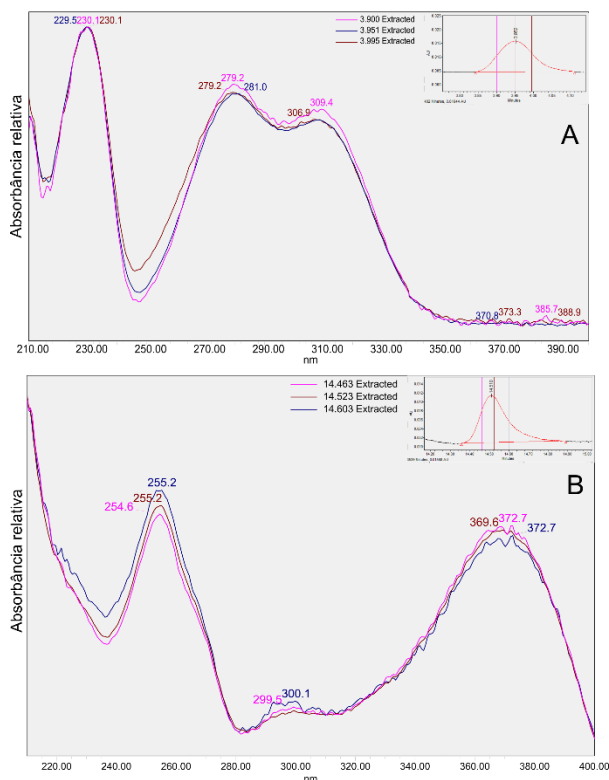


FIGURA 4.31 – Pureza de banda determinada pelo perfil UV de vanilina (A) e quercetina (B) em três diferentes tempos de retenção das respectivas bandas cromatográficas do extrato obtido a partir da extração por EAU-HCl.

Após a otimização da corrida cromatográfica e identificação das bandas de acordo com os compostos-alvo, foi possível realizar a curva analítica para quantificação de quercetina e vanilina em amostras de resíduos de goiaba. Os fatores de qualidade calculados para esta regressão linear (Tabela 4.10) demonstraram ser aceitáveis em termos de linearidade, e os limites de detecção e quantificação estiveram dentro do esperado para esta análise. Novamente, o volume de injeção de 2 µL possibilitou uma maior sensibilidade do método, como pode ser avaliado para os LDs e LQs, apesar de um erro maior (em termos de resíduos da regressão linear) ter elevado os valores para a curva analítica da quercetina.

TABELA 4.10 – Equações das curvas analíticas, coeficiente de determinação e limites de detecção e de quantificação utilizados para os experimentos EAU-HCl.

Composto	Equação	R ²	LD	LQ
			mg L ⁻¹	
Quercetina	$y = 10460,84x - 20648,90$	0,9989	0,70	2,32
Vanilina	$y = 17828,44x - 1070,07$	0,9999	0,19	0,62

4.2.2 – *Extrações, planejamentos fatoriais e superfícies de resposta*

4.2.2.1 – *Extração Assistida por Homogeneizador em soluções etanólicas ácidas (EAH-HCl)*

Este ensaio teve como objetivo principal a análise preliminar do efeito da presença do ácido clorídrico (HCl) na eficiência de extração de quercetina e vanilina, tendo como base um planejamento fatorial de face centrada para avaliação do efeito das duas variáveis nas respostas, que podem ser vistas na Tabela 4.11. A hipótese inicial era avaliar o aumento da eficiência de extração causado por: 1) rompimento das paredes celulares das células da planta por meio da hidrólise ácida dos polissacarídeos que as constituem, liberando os solutos para a solução; 2) conversão de espécies glicosiladas em aglicosiladas, como os dois marcadores de referência escolhidos, a partir da hidrólise ácida das ligações entre os núcleos e as moléculas de glicose.

Para a quercetina, como pode ser visto nos experimentos 6, 7 e 8, foram encontradas respostas abaixo do limite de detecção. Como este foi apenas um teste preliminar, os cálculos dos efeitos das variáveis e do modelo polinomial para superfícies de resposta foram realizados considerando estes valores nulos. A partir

da análise dos efeitos das variáveis, é possível avaliar uma alta influência da concentração do ácido nas respostas em comparação ao tempo de extração (Apêndice 1). Calculados os modelos polinomiais, foi encontrado um ajuste fraco para a vanilina ($R^2=0,782$) com p-valores fora dos níveis aceitáveis ($p>0,05$ para a regressão). Já para a quercetina, estes valores estavam dentro de níveis aceitáveis ($R^2=0,983$; $p<0,05$ para a regressão e $p>0,05$ para a falta de ajuste). As tabelas ANOVA podem ser encontradas no Apêndice 2.

TABELA 4.11 – Planejamento fatorial de face centrada e as respostas de quercetina e vanilina de acordo com método EAH-HCl

Exp.	Concentração do IL (X_1)		Tempo (X_2)		Respostas	
	Cód.	Real	Cód.	Real	Quercetina	Vanilina
	(mol L ⁻¹)		min		mg kg ⁻¹	
1	0	0,50	0	105	20,75	48,71
2	0	0,50	0	105	19,71	48,43
3	0	0,50	0	105	19,02	45,91
4	1	1,00	1	180	25,64	46,61
5	1	1,00	-1	30	20,24	49,36
6	-1	0,01	1	180	*	34,41
7	-1	0,01	-1	30	*	34,92
8	-1	0,01	0	105	*	36,55
9	1	1,00	0	105	25,87	42,05
10	0	0,50	1	180	19,14	44,29
11	0	0,50	-1	30	21,94	40,45

* abaixo do limite de quantificação

As superfícies de resposta confirmam o efeito majoritário da concentração do ácido (Figura 4.32), que otimizaram a extração em níveis próximos do máximo selecionado para este planejamento fatorial (1 mol L⁻¹). É possível observar que a variável X_2 , tempo de extração, demonstra pouco efeito nas eficiências de extração de vanilina e quercetina, com ligeira tendência de alta em tempos maiores que 120 minutos para o segundo. As variáveis ótimas, calculadas a partir do modelo polinomial, são: para a quercetina (25,76 mg kg⁻¹), $X_1=0,9$ mol L⁻¹ e $X_2=180$ min; para a vanilina (47,75 mg kg⁻¹), $X_1=0,8$ mol L⁻¹ e $X_2=98,2$ min.

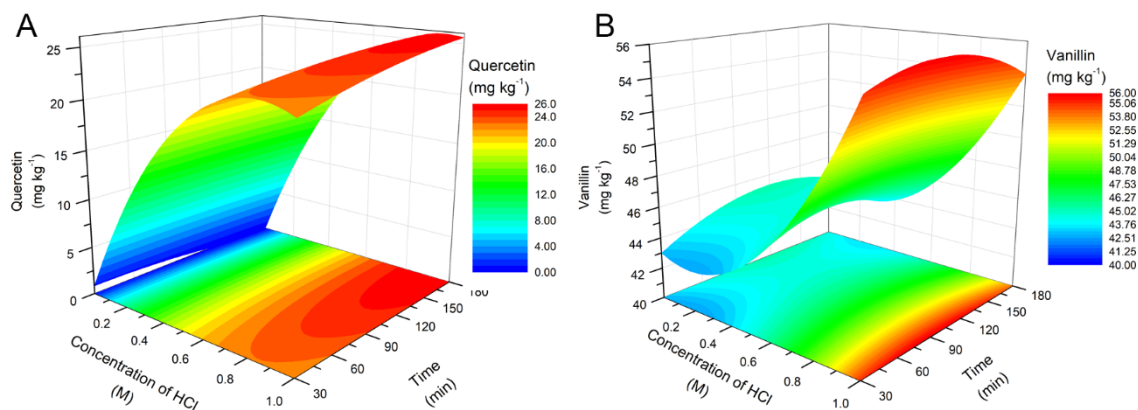


FIGURA 4.32 – Metodologia de superfície de resposta para a extração de quercetina (A) e vanilina (B) de acordo com o método EAH-HCl

O nível de tempo mínimo (30 minutos) foi selecionado para essa otimização devido à baixa eficiência de extração de quercetina em tempos curtos, característica observada para o procedimento com meio ácido. Desta forma, foi necessário encontrar métodos que sejam eficientes e funcionais em tempos mais longos de extração, sendo essa uma limitação observada na técnica com homogeneizador (EAH), com mal funcionamento deste equipamento após os experimentos realizados. A partir dos resultados obtidos neste planejamento fatorial, também foi observado que concentrações maiores que 1 mol L^{-1} podem indicar uma maior eficiência de extração. Por estes motivos, uma nova técnica de extração foi selecionada (ultrassom), para ensaios da evolução temporal da eficiência de extração e posterior otimização dos parâmetros que afetam esta técnica.

4.2.2.2 – Extração Assistida por Ultrassom em soluções etanólica ácidas (EAU-HCl)

a) Estudo temporal com HCl e ácido orgânicos verdes

O objetivo inicial deste ensaio foi avaliar a evolução temporal, semelhante a um estudo de cinética de reação, da eficiência de extração dos dois marcadores de referência dos resíduos da goiaba em soluções etanólicas ácidas. Foram realizadas extrações utilizando parâmetros fixos da metodologia desenvolvida para a EAU, em diferentes tempos, para solventes etanólicos (70% de etanol em água) com e sem a presença de ácido clorídrico, em uma concentração de 1 mol L^{-1} . Também foram feitas extrações, em tempo fixo de 90 minutos, com os ácidos

orgânicos cítrico, ascórbico e acético. Todos os resultados estão presentes na Figura 4.33.

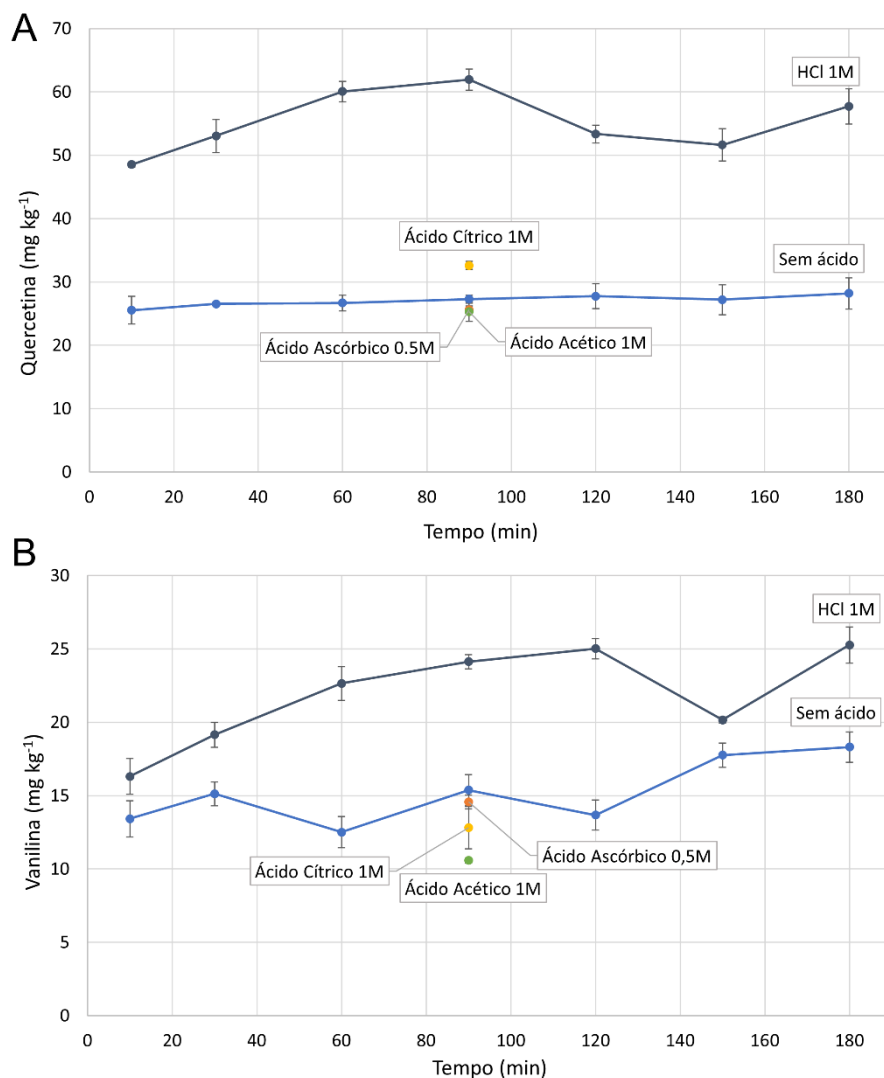


FIGURA 4.33 – Estudo temporal da extração ácida de quercetina (A) e vanilina (B) com soluções aquosas de etanol (70%): sem ácido (azul claro), com HCl (azul escuro), ácido cítrico (amarelo), ácido ascórbico (laranja) e ácido acético (verde). As barras de erro representam o desvio padrão das triplicatas de cada experimento.

Para a quercetina, é possível observar uma maior diferença, logo a partir de 10 minutos de extração, entre as eficiências de extração com e sem a presença de HCl. No ensaio apenas com etanol e água, uma pequena variação foi encontrada entre 10 e 180 minutos, atingindo o máximo em 28,21 mg kg⁻¹. Já para o ensaio em HCl 1 mol L⁻¹, foi possível observar uma clara evolução na concentração de quercetina com o tempo, atingindo o pico em 90 minutos (61,95 mg kg⁻¹), que em seguida reduziu

em 120 e 150 min e voltou a subir em 180 minutos de extração. A esta flutuação podem ser associados diversos fatores, entre eles a instabilidade do composto pelo efeito do próprio ácido e outros fatores externos^{206,207}. Efeitos semelhantes ocorreram para a vanilina, apesar da maior proximidade entre as curvas com e sem a presença de HCl. Utilizando o ácido, a extração de vanilina obteve uma curva crescente de acordo com o tempo, atingindo seu máximo em 180 min (25,27 mg kg⁻¹), após variações negativas em 150 minutos. Para o ensaio sem a presença de ácido, após flutuações entre 30 e 120 min, a concentração de vanilina se estabilizou e atingiu seu máximo também em 180 min (18,32 mg kg⁻¹). Ao comparar as eficiências de extração em ácidos orgânicos com tempo de extração fixo em 90 minutos, foram obtidos valores de resposta significativamente inferiores aos obtidos utilizando o ácido clorídrico para ambos analitos.

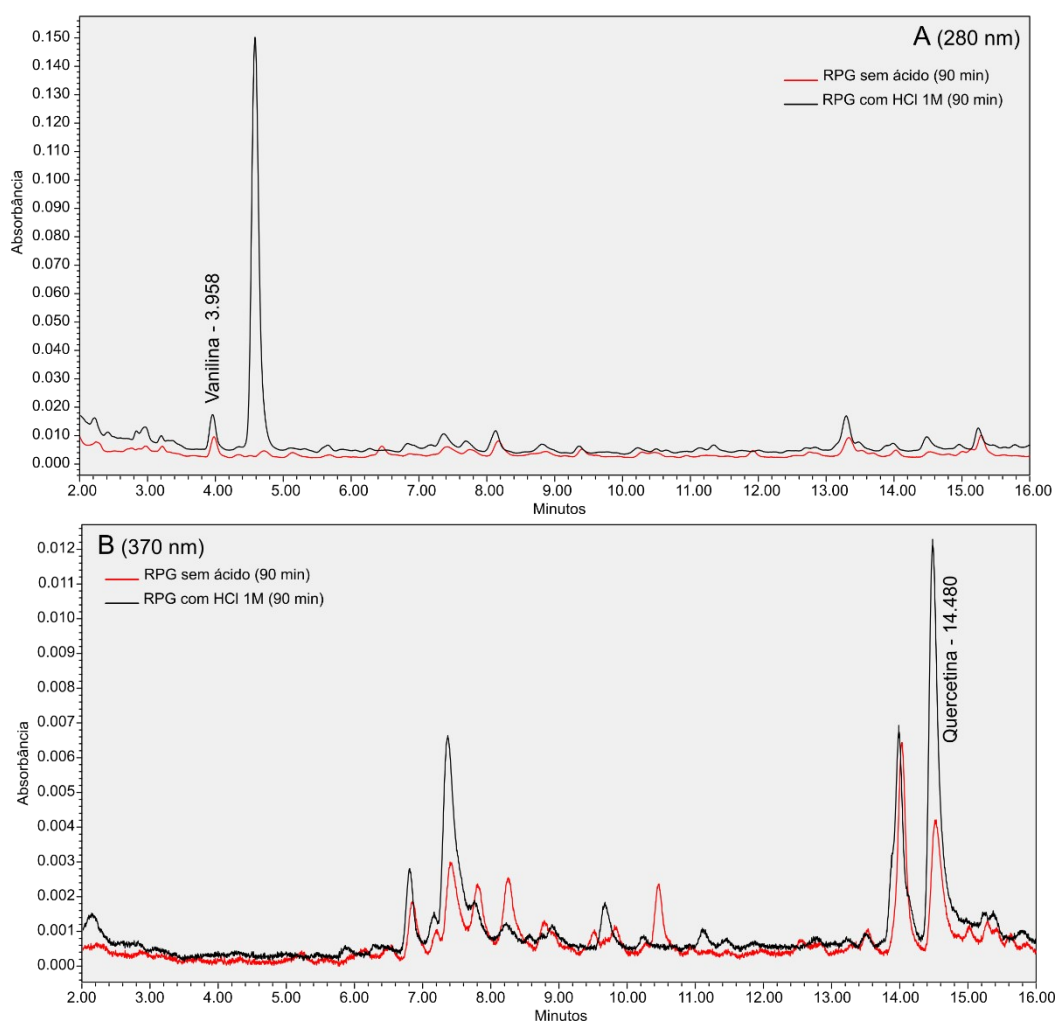


FIGURA 4.34 – Cromatogramas comparativos entre extratos obtidos a partir de resíduo de goiaba em solvente etanólico sem (vermelho) e com a presença de HCl 1M (preto), registrados em 280 (A) e 370 nm (B).

Avaliando o cromatograma dos extratos obtidos com e sem a presença de HCl (Figura 4.34), é possível observar relativa mudança no perfil químico destes extratos. Em 280 nm, há surgimento de uma banda de alta intensidade em 4,5 min, que não pôde ser identificado a partir do modelo de detecção utilizado neste método. Além disso, outras bandas aparecem em maior intensidade no extrato obtido a partir da extração ácida, o que poderia ser associado à uma conversão de diversos compostos glicosilados em aglicosilados, bem como outras reações químicas que podem ser favorecidas em ambientes ácidos. Como foi possível observar um aumento na eficiência de extração de vanilina e quercetina, testes para melhoria da extração ácida tomando como base estes marcadores de referência foram realizados para otimização da técnica de ultrassom de acordo com os parâmetros selecionados.

b) Otimização da EAU-HCl com planejamento fatorial

Observados os valores de tempo de extração que demonstraram estabilidade na obtenção de quercetina e vanilina em extratos etanólicos ácidos, níveis entre 60 e 120 minutos foram selecionados para melhor avaliar os pontos de otimização da EAU. Esta variável e as outras selecionadas para o planejamento de *Box-Behnken*, seus níveis e respostas de eficiência de extração para cada experimento podem ser encontradas na Tabela 4.12. As respostas já nos permitem observar que valores superiores foram obtidos em comparação ao ensaio anterior, visto que a quercetina foi encontrada em 83,54 mg kg⁻¹ (experimento 21) e a vanilina em 45,57 mg kg⁻¹ (experimento 18), curiosamente ambos em experimentos utilizando 0,5 mol L⁻¹ de HCl.

Na análise dos efeitos das variáveis para a quercetina (Apêndice 1), observa-se maior influência das variáveis X₂ (amostra-solvente) e X₄ (concentração de HCl), ambas com valores negativos (melhor extração em níveis próximos do mínimo). Para a vanilina tendências semelhantes são encontradas, porém há maior efeito, também negativo, da variável X₁ (concentração de etanol/água). As respostas foram modeladas em equações polinomiais, que permitiram sua plotagem em superfícies de resposta (Figura 4.35 e Figura 4.36).

TABELA 4.12 – Planejamento fatorial *Box-Behnken* para o método EAU-HCl e as respectivas respostas de quercetina e vanilina.

Exp.	Etanol/Água (X ₁)		Amostra-solvente (X ₂)		Tempo (X ₃)		Conc. de HCl (X ₄)		Respostas	
	Cod.	Real	Cod.	Real	Cod.	Real	Cod.	Real	Quercetina	Vanilina
	-	%v/v	-	g mL ⁻¹	-	min	-	mol L ⁻¹	mg kg ⁻¹	
1	-1	60	-1	0,10	0	90	0	1,25	55,23	35,92
2	1	80	-1	0,10	0	90	0	1,25	57,36	22,38
3	-1	60	1	0,30	0	90	0	1,25	39,26	28,48
4	1	80	1	0,30	0	90	0	1,25	39,29	21,05
5	-1	60	0	0,20	-1	60	0	1,25	59,80	29,76
6	1	80	0	0,20	-1	60	0	1,25	71,39	29,11
7	-1	60	0	0,20	1	120	0	1,25	49,17	31,21
8	1	80	0	0,20	1	120	0	1,25	48,20	22,08
9	-1	60	0	0,20	0	90	-1	0,50	53,05	35,13
10	1	80	0	0,20	0	90	-1	0,50	44,49	22,87
11	-1	60	0	0,20	0	90	1	2,00	29,60	29,97
12	1	80	0	0,20	0	90	1	2,00	29,40	27,98
13	0	70	-1	0,10	-1	60	0	1,25	66,26	32,90
14	0	70	1	0,30	-1	60	0	1,25	58,38	28,10
15	0	70	-1	0,10	1	120	0	1,25	64,50	38,70
16	0	70	1	0,30	1	120	0	1,25	46,81	31,81
17	0	70	0	0,20	-1	60	-1	0,50	64,60	37,24
18	0	70	0	0,20	1	120	-1	0,50	79,30	45,57
19	0	70	0	0,20	-1	60	1	2,00	48,37	32,32
20	0	70	0	0,20	1	120	1	2,00	37,52	28,66
21	0	70	-1	0,10	0	90	-1	0,50	83,54	43,71
22	0	70	1	0,30	0	90	-1	0,50	56,11	31,09
23	0	70	-1	0,10	0	90	1	2,00	62,65	36,27
24	0	70	1	0,30	0	90	1	2,00	34,85	23,07
25	0	70	0	0,20	0	90	0	1,25	68,88	33,88
26	0	70	0	0,20	0	90	0	1,25	73,87	33,39
27	0	70	0	0,20	0	90	0	1,25	74,63	31,77

Ambos os modelos calculados obtiveram valores de ajuste razoáveis ($R^2=0,870$ e $0,842$), com testes estatísticos dentro dos níveis aceitáveis para regressão e falta de ajuste, de acordo com análise de variância (Apêndice 2).

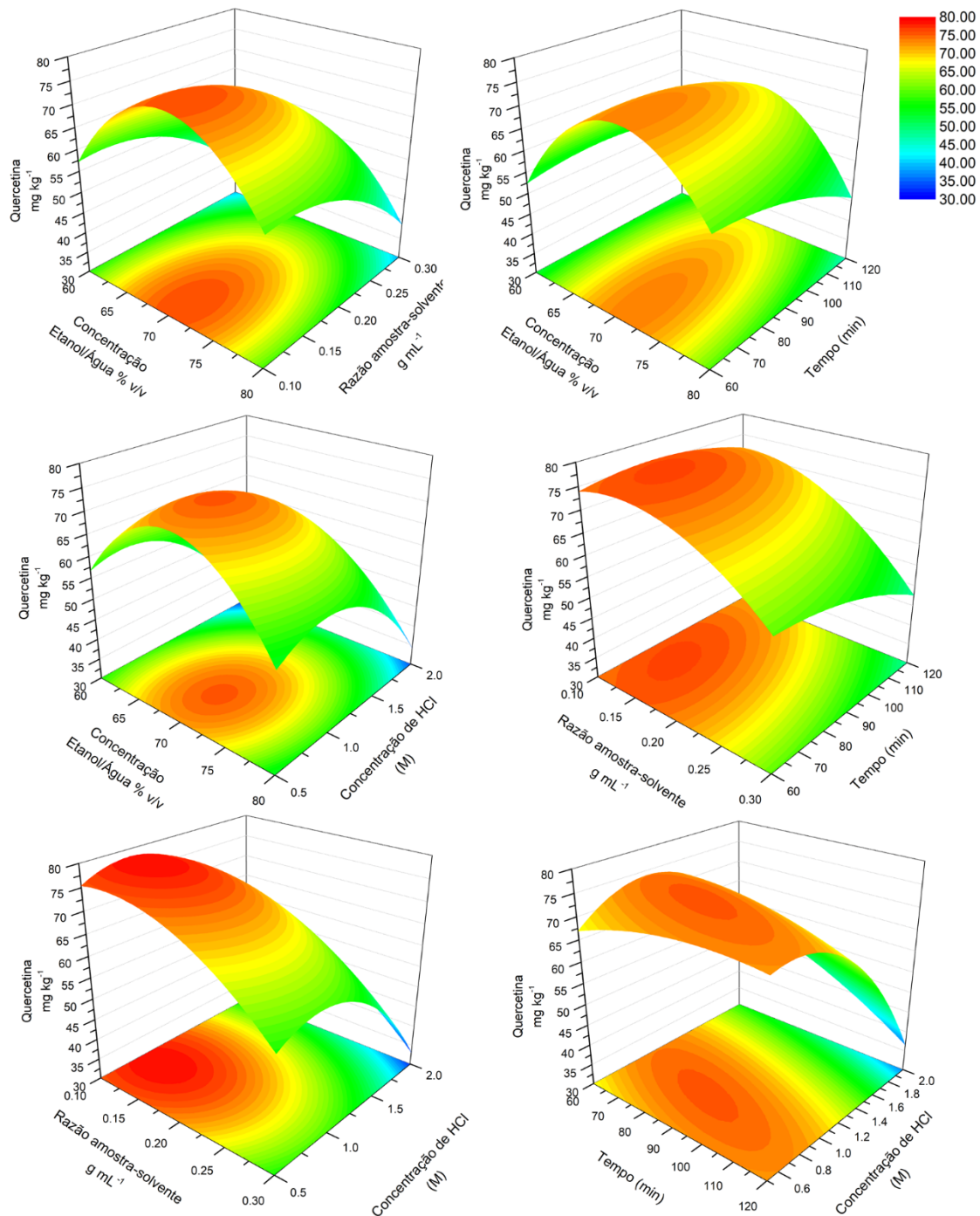


FIGURA 4.35 – Metodologia de superfície de resposta para a otimização da extração de quercetina a partir de resíduo de goiaba utilizando o método EAU-HCl

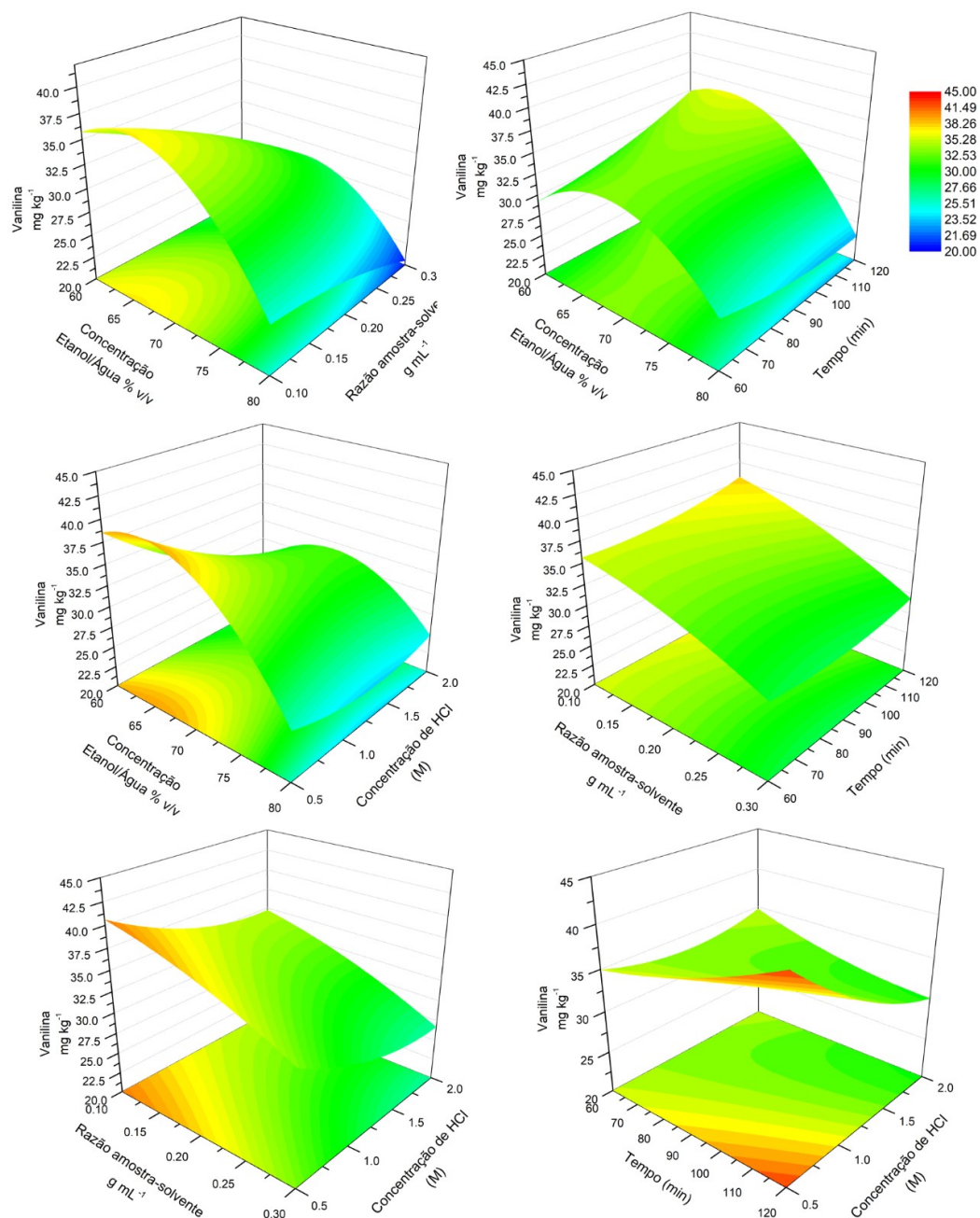


FIGURA 4.36 – Metodologia de superfície de resposta para a otimização da extração de vanilina a partir de resíduo de goiaba utilizando o método EAU-HCl

A análise das superfícies de resposta mostra que os parâmetros que indicam uma maior eficiência de extração de quercetina estão em valores médios dos níveis selecionados, mostrando uma boa escolha dos extremos definidos para esta otimização. Os parâmetros ótimos obtidos para a quercetina, obtendo um máximo teórico em 79,17 mg kg⁻¹ são: $X_1=69\%_{v/v}$, $X_2=0,12\text{ g mL}^{-1}$, $X_3= 104\text{ min}$, $X_4= 0,78\text{ mol L}^{-1}$.

Já para a vanilina, valores mais próximos dos extremos foram identificados por otimizar a extração, exceto para a concentração de etanol/água, que indicou melhores respostas em 60-70%_{v/v}. Os valores calculados que obtêm um máximo ótimo de 50,19 mg kg⁻¹ para a vanilina são: X₁=61 %_{v/v}, X₂=0,10 g mL⁻¹, X₃=120 min, X₄= 0,50 mol L⁻¹.

Os valores encontrados atestam a necessidade da análise multivariada dos efeitos dos parâmetros em processos que apresentam um maior número de variáveis, observando não só efeitos independentes, mas também suas interações. A interação entre os parâmetros de concentração de HCl e tempo de extração para a quercetina, por exemplo, se mostrou mais relevante para definição do parâmetro ótimo em 0,78 mol L⁻¹ e 104 minutos, tempo que foi observado como ótimo em outros níveis nas superfícies de resposta que envolviam outras variáveis.

O tempo de extração encontrado por otimizar a quercetina se mostrou consistente com o observado no ensaio anterior, mesmo que em concentrações inferiores de HCl. Este, por sinal, é um ótimo resultado obtido nesta otimização (X₄=0,78 e 0,50 mol L⁻¹), demonstrando a importância deste ensaio para utilização de soluções ácidas mais brandas. A concentração de etanol/água também se mostrou consistente, atestando a importância da solubilidade dos solutos nas extrações sólido-líquido, sendo encontrada em valores semelhantes aos outros flavonoides estudados em relação à quercetina, e ligeiramente menores para a mais polar molécula de vanilina. Por fim, a razão amostra-solvente, demonstrando ser um parâmetro singular para cada tipo de extração, foi encontrada próxima do nível mínimo de 0,10 g mL⁻¹, indicando necessitar de maiores proporções de solventes em relação às outras extrações estudadas neste trabalho.

4.2.3 – Comparação entre diferentes métodos de secagem

Foram realizadas comparações entre as mesmas amostras de resíduo de goiaba (RPG/LC), secas em estufa e por técnica de liofilização, em termos de comparação do perfil químico a partir de cromatogramas exploratórios (Figura 4.37) e eficiência de extração de quercetina e vanilina (Figura 4.38). É possível observar uma maior extração de quercetina nas amostras obtidas a partir de liofilizador (26% superior), enquanto as secas em estufa demonstraram melhor eficiência para a vanilina (29% superior). Na soma das concentrações, o uso da técnica de liofilização

foi ligeiramente melhor ($67,5 \text{ mg kg}^{-1}$) em relação à estufa ($64,5 \text{ mg kg}^{-1}$), valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Por fim, a análise do perfil químico demonstrou similaridade entre as amostras, com o surgimento de uma banda no extrato obtido a partir da amostra liofilizada (11 min, 254 e 280nm), inexistente no outro extrato.

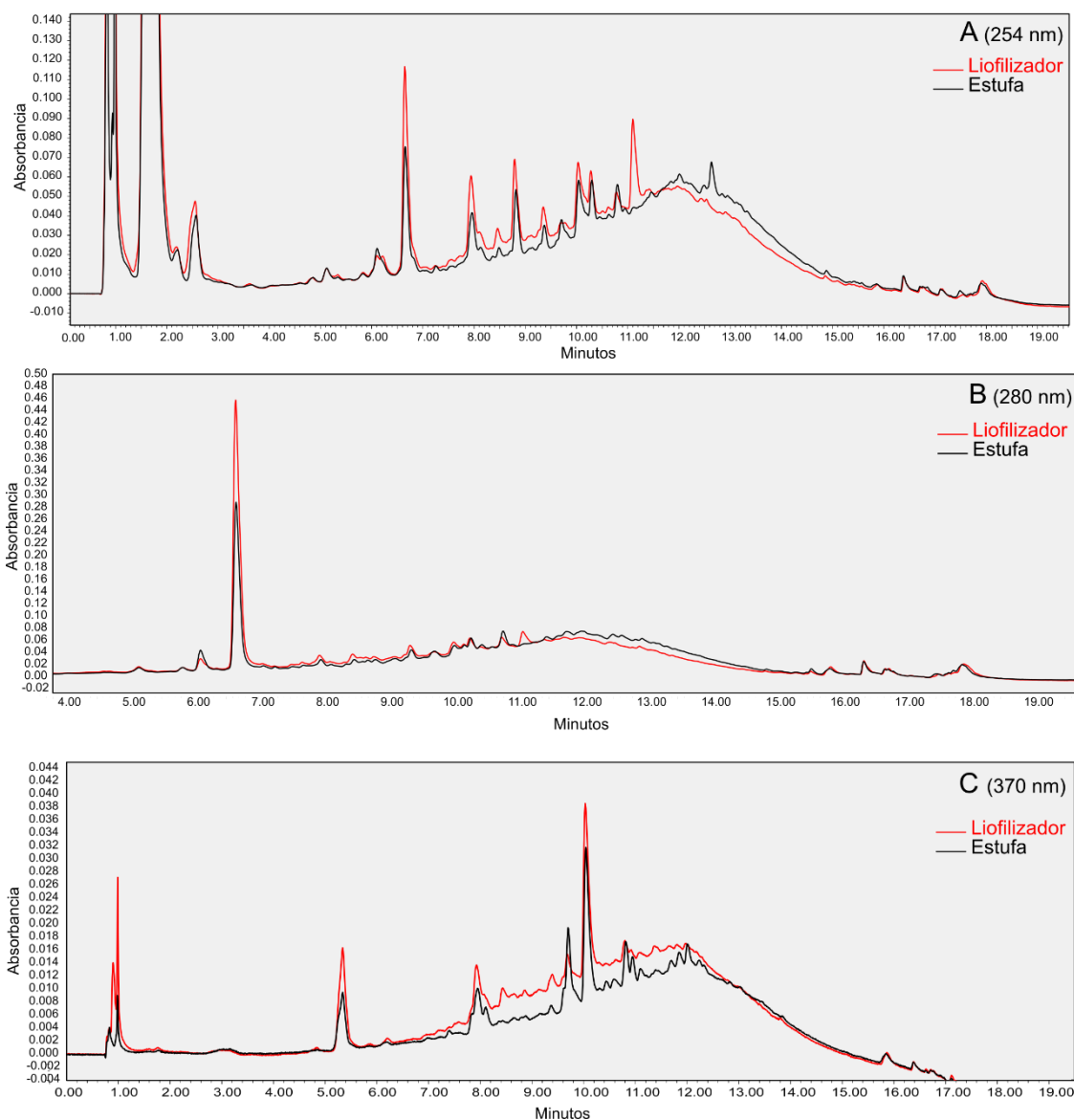


FIGURA 4.37 – Cromatogramas exploratórios das amostras de resíduo de goiaba obtidas a partir de secagem com estufa (em preto) e liofilizador (vermelho), em comprimentos de onda de 254 (A), 280 (B) e 370 nm (C).

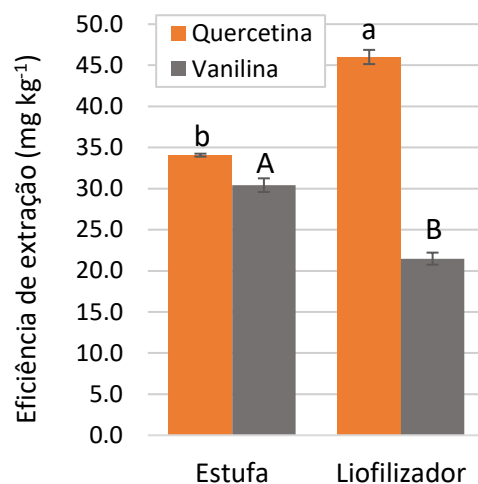


FIGURA 4.38 – Resultados comparativos da eficiência de extração de quercetina e vanilina a partir de amostras secas em estufa e liofilizador. As barras de erro representam o desvio padrão das triplicatas e as letras mostram as diferenças estatísticas das médias de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$) para quercetina (letras minúsculas) e vanilina (letras maiúsculas).

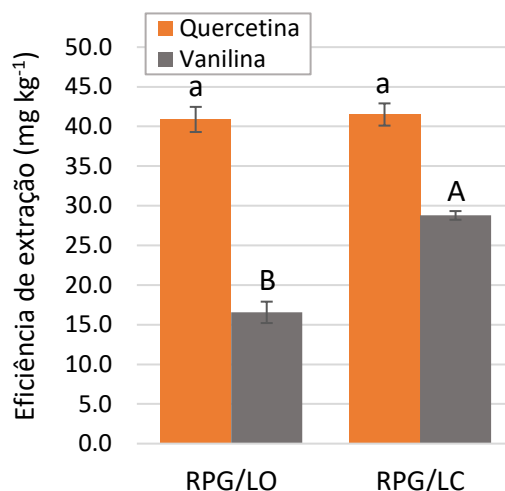


FIGURA 4.39 – Resultados comparativos da eficiência de extração de quercetina e vanilina a partir das diferentes amostras de resíduo de goiaba: processamento laboratorial de goiaba orgânica (RPG/LO), processamento laboratorial de goiaba convencional (RPG/LC). As barras de erro representam o desvio padrão das triplicatas e as letras mostram as diferenças estatísticas das médias de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$) para quercetina (letras minúsculas) e vanilina (letras maiúsculas).

4.2.4 – Comparação entre diferentes amostras

A comparação entre diferentes amostras foi realizada com extrações feitas com resíduos de goiaba obtidos em laboratório a partir de frutas orgânicas (RPG/LO) e convencionais (RPG/LC), condicionadas sob mesma metodologia (secagem em estufa). Como pode ser visto na Figura 4.39, em termos de eficiência de extração, ambas amostras obtiveram concentrações de quercetina estatisticamente iguais (cerca de 40 mg kg^{-1}), porém com superioridade na concentração de vanilina na amostra de goiaba convencional ($28,8 \pm 0,5 \text{ mg kg}^{-1}$) em

relação à orgânica ($16,6 \pm 1,3 \text{ mg kg}^{-1}$). Isso se repetiu na soma dos analitos (convencional $70,3 \text{ mg kg}^{-1}$; orgânica $57,4 \text{ mg kg}^{-1}$), que foram significativamente diferentes ($p < 0,05$). Poucas diferenças foram observadas nos perfis químicos das duas amostras (Figura 4.40), tendo a amostra convencional (RPG/LC) uma linha de base de intensidade ligeiramente superior à encontrada na amostra orgânica para todos os comprimentos de onda estudados neste ensaio cromatográfico exploratório.

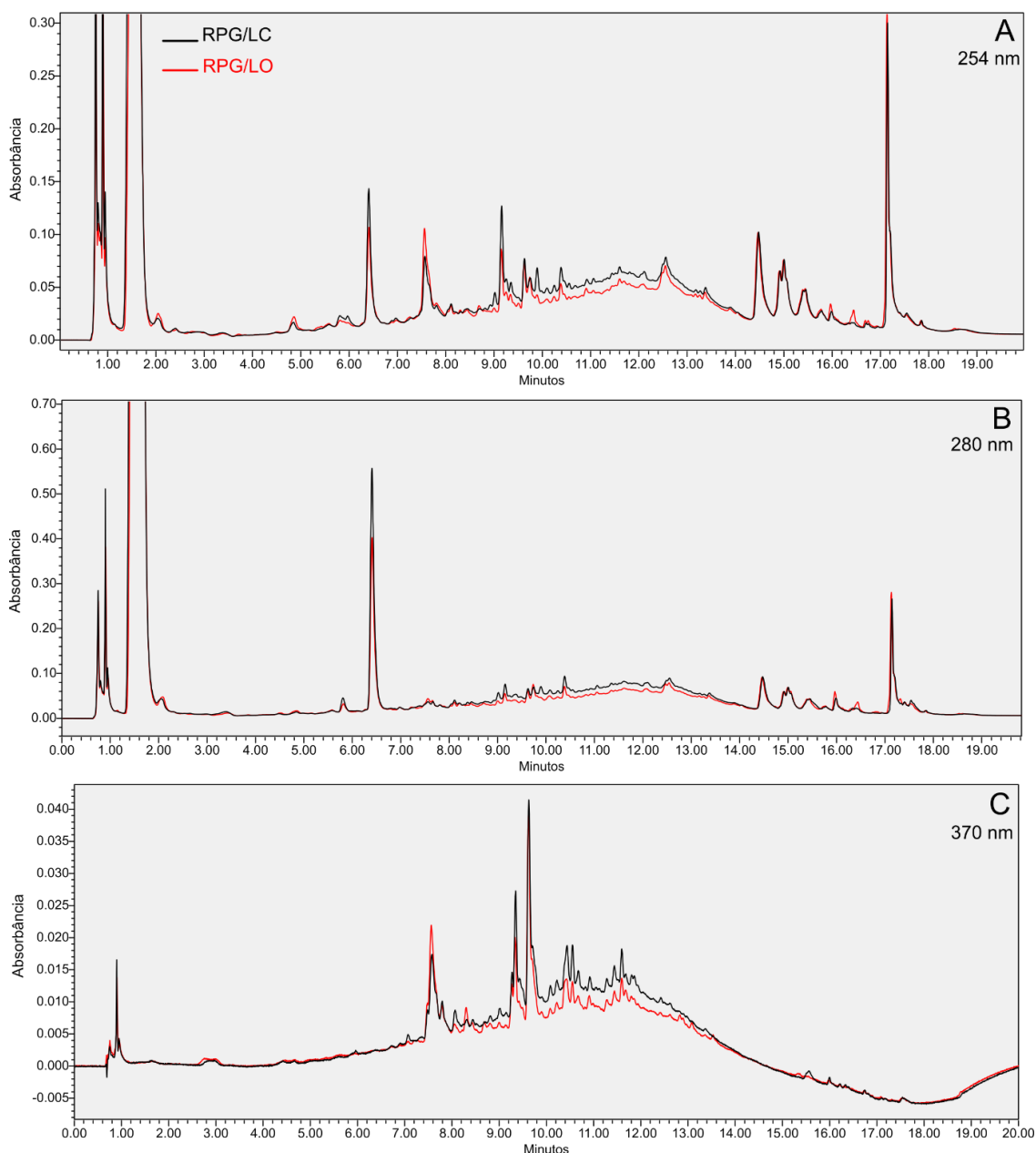


FIGURA 4.40 – Cromatogramas exploratórios das diferentes amostras de resíduo de goiaba obtidas a partir de processamento laboratorial de goiaba orgânica (RPG/LO – vermelho) e processamento laboratorial de goiaba convencional (RPG/LC - preto) e orgânica (RPM/LO - preto) nos comprimentos de onda de 254 (A), 280 (B) e 370 (C) nm.

4.3 – Laranja (*Citrus sinensis*)

4.3.1 – Método cromatográfico e curva analítica

Para a detecção e quantificação do flavonoide hesperidina em extratos provenientes das cascas da laranja, foi realizado um método cromatográfico em UHPLC. Após otimização do método, foi possível observar a presença do composto no extrato em 6,3 min, mesmo tempo de retenção da banda obtida com solução do padrão analítico (Figura 4.41).

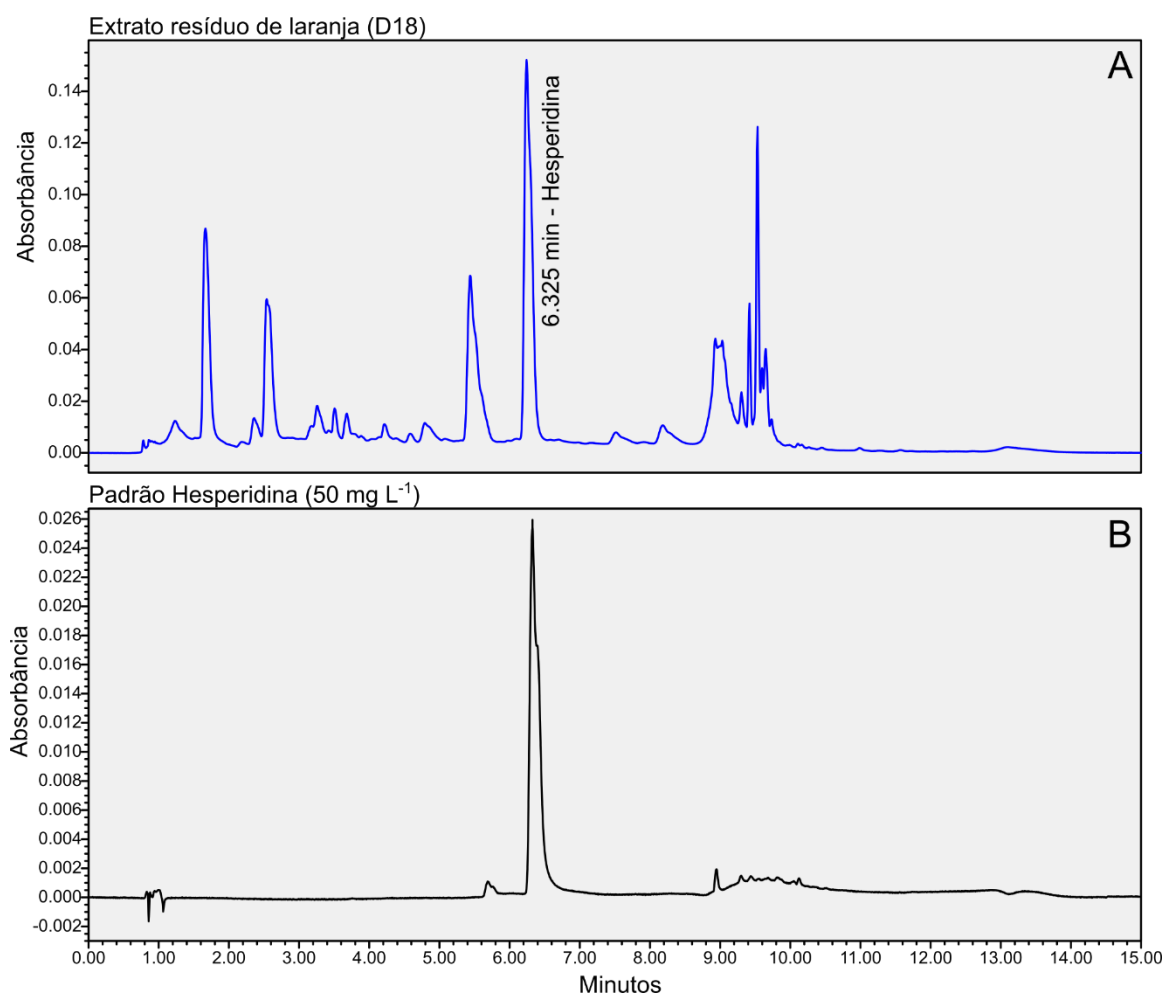


FIGURA 4.41 – Cromatogramas do extrato de resíduo de laranja (A) e da solução padrão de hesperidina (B), registrados em 280 nm.

Assim como nos outros métodos cromatográficos, também foram avaliados os perfis de absorção UV da solução padrão e extrato. Como pode ser visto na Figura 4.42, o espectro de absorção UV encontrado na banda investigada no extrato tem perfil semelhante ao do padrão analítico de hesperidina, também podendo observar pouca variação deste perfil em diferentes pontos das bandas (espectro B).

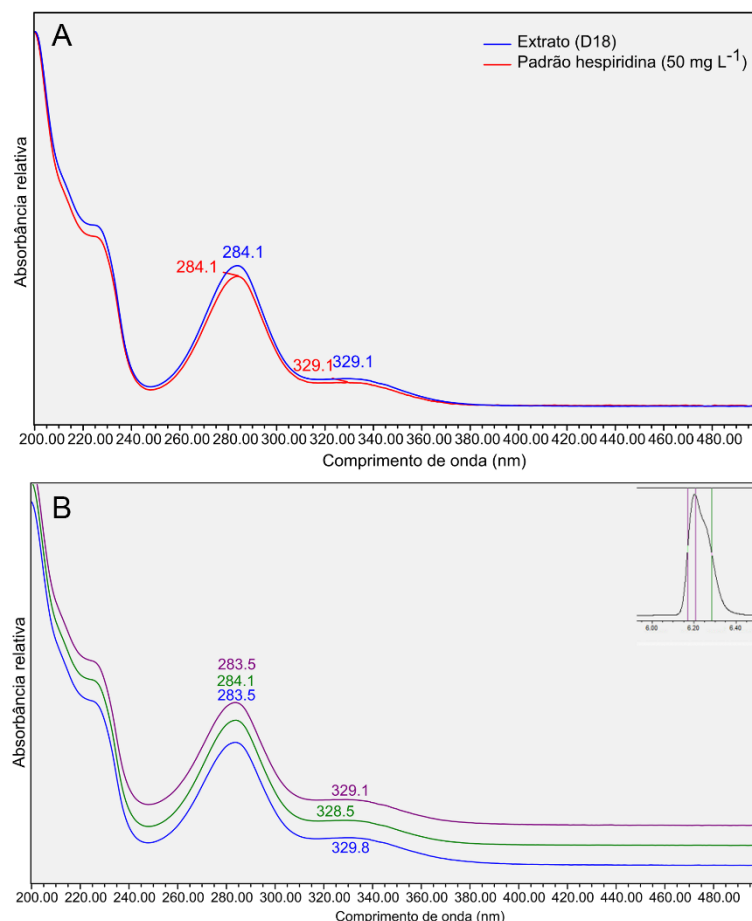


FIGURA 4.42 – Perfil UV das bandas referentes à hesperidina em solução de padrão (vermelho) e no extrato de resíduo de laranja (azul) no espectro A. No espectro B, pureza de banda determinada pelo perfil UV de hesperidina em três diferentes tempos de retenção da banda cromatográfica do extrato de resíduo de laranja.

Foram realizadas, desta forma, curvas analíticas cujos parâmetros estão resumidos na Tabela 4.13. É possível observar valores relativamente altos de LD e LQ, justificados pela faixa de concentração selecionada para realização da curva analítica, que iniciou em 50 mg L⁻¹. Isto se deu pela alta concentração de hesperidina encontrada na maioria dos extratos provenientes de casca de laranja, não necessitando de quantificações em valores menores que o mínimo selecionado. Ainda assim, a regressão linear obtida teve um bom valor de coeficiente de determinação (R²), o que demonstra linearidade na faixa de concentrações escolhida.

TABELA 4.13 – Equações das curvas analíticas, coeficiente de determinação e limites de detecção e de quantificação utilizados para os experimentos realizados com resíduos de laranja.

Composto	Equação	R ²	LD	LQ
			mg L ⁻¹	
Hesperidina	y = 4272,13x - 5822,94	0,9986	12,20	40,66

4.3.2 – Parâmetros de Hansen e testes de solubilidade

Antes da realização dos ensaios de extração com as amostras de resíduo de laranja, foi realizada a determinação dos parâmetros de Hansen do soluto (hesperidina), de forma teórica e empírica, além da procura e otimização de solventes e misturas de solventes que poderiam demonstrar maior solubilidade ao soluto, para conseqüentemente serem testados como meios líquidos nas extrações.

A partir da estrutura molecular da hesperidina, com auxílio da ferramenta DIY do *software* HSPiP, foi possível obter os parâmetros de Hansen teóricos do soluto, sendo estes: $\delta_D=19,6$, $\delta_P=10,3$ e $\delta_H=13,9$. Estes parâmetros calculados foram utilizados apenas para fins de comparação. De acordo com a lista de solventes selecionados, foram realizados testes de solubilidade ao designar pontuações a partir da avaliação visual das misturas entre os solventes puros e o padrão analítico de hesperidina. Os valores de pontuação são utilizados pelo *software* para a modelagem e determinação dos parâmetros de Hansen empíricos do soluto, e conseqüentemente seus valores de RED em relação a cada solvente, que podem ser vistos na Tabela 4.14.

A esfera de Hansen calculada para a hesperidina a partir dos testes empíricos de solubilidade com solventes puros (Figura 4.43), obtida com valores de raio de $\pm (1,25, 0,65, 0,50)$ ($\delta_D, \delta_P, \delta_H$) e com um ajuste (R^2) de 0,956, resultou em parâmetros empíricos para hesperidina de $\delta_D=17,3$, $\delta_P=21,2$ e $\delta_H=18,1$.

TABELA 4.14 – Pontuações dadas aos solventes selecionados no teste empírico de solubilidade, seus respectivos parâmetros de solubilidade de Hansen e valores calculados de RED. (continua)

Solvente	δ_D	δ_P	δ_H	Pontuação	RED
Dimetilsulfóxido (DMSO)	18,4	16,4	10,2	1	0,713
<i>N,N'</i> -Dimetilformamida (DMF)	17,4	13,7	11,3	1	0,778
Metanol (MeOH)	14,7	12,3	22,3	2	0,891
Anidrido acético	16	11,7	10,2	5	0,979*
Acetonitrila	15,3	18	6,1	5	1
<i>N,N'</i> -Dimetilacetamida (DMAc)	16,8	11,5	9,4	1	1,005*
Etilenoglicol (EG)	17	11	26	1	1,008*
Etanol (EtOH)	15,8	8,8	19,4	5	1,009
Ácido fórmico	14,6	10	14	1	1,030*
<i>Cyrene</i>	18,9	12,4	7,1	4	1,09
Ácido acético	14,5	8	13,5	5	1,178
Isopropanol	15,8	6,1	16,4	5	1,206
Acetona	15,5	10,4	7	5	1,225
1-Butanol	16	5,7	15,8	5	1,234
Diclorometano (DCM)	17	7,3	7,1	5	1,358

TABELA 4.14 (cont.) – Pontuações dadas aos solventes selecionados no teste empírico de solubilidade, seus respectivos parâmetros de solubilidade de Hansen e valores calculados de RED.

Solvente	δ_D	δ_P	δ_H	Pontuação	RED
Metiletilcetona (MEK)	16	9	5,1	5	1,381
Tetrahydrofurano (THF)	16,8	5,7	8	3	1,421
Acetato de etila	15,8	5,3	7,2	5	1,5
1,4-Dioxano	17,5	1,8	9	4	1,64
Clorofórmio	17,8	3,1	5,7	5	1,676
Éter etílico	14,5	2,9	4,6	5	1,799
d-Limoneno	17,2	1,8	4,3	5	1,818
α -Pinenos	16,9	1,8	3,1	5	1,873
Água	15,5	16	42,3	5	1,919
Tolueno	18	1,4	2	5	1,946
Benzeno	18,4	0	2	4	2,032
Tetracloreto de carbono	17,8	0	0,6	5	2,094
Ciclohexano	16,8	0	0,2	5	2,117
Heptano	15,3	0	0	5	2,152
Hexano	14,9	0	0	5	2,163

* representa solventes erroneamente posicionados dentro ou fora da esfera de Hansen

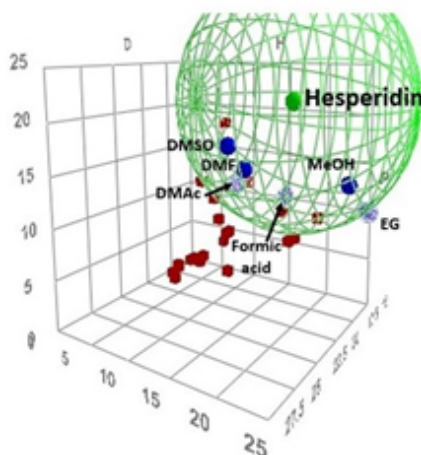


FIGURA 4.43 – Esfera de solubilidade de Hansen obtida a partir do teste de solubilidade realizado com solventes puros. Esferas azuis representam os solventes posicionados dentro da esfera e quadrados vermelhos representam solventes posicionados fora, de acordo com o cálculo do raio da esfera realizado.

Após cálculo dos parâmetros empíricos, foi possível realizar a triagem e otimização de misturas dos solventes disponíveis com a ferramenta *Solver* do Excel. Como o parâmetro R_0 (raio da esfera de solubilidade) é uma constante, a minimização da distância entre soluto e solvente no espaço de Hansen foi realizada com base no parâmetro R_a , em vez de RED ($RED=R_a/R_0$), utilizando as frações volumétricas das misturas como células variáveis. Os valores de R_a encontrados após otimização das frações volumétricas de misturas binárias, bem como as misturas ternárias com o

solvente *cyrene*, podem ser vistos na Tabela 4.15 (apenas as misturas com menor R_a estão na tabela).

TABELA 4.15 – Valores de R_a obtidos em diferentes misturas selecionadas (menores valores de R_a e suas composições otimizadas).

Solventes/Misturas	R_a	Composição (%v/v)
Misturas binárias		
MeOH/DMSO	7.14	57/44
H2O/DMSO	7.72	24/76
H2O/Acetona	8.33	31/69
<i>Cyrene</i> /MeOH	8.40	26/74
MeOH/Acetona	8.47	72/28
MEK/MeOH	8.76	21/79
Etilenoglicol/DMSO	9.06	38/62
H2O/ <i>Cyrene</i>	9.53	33/66
EtOH/ <i>Cyrene</i>	11.29	73/23
Misturas ternárias		
<i>Cyrene</i> /H2O/Acetona	8.33	1/31/68
<i>Cyrene</i> /MeOH/Acetona	8.37	18/72/9
<i>Cyrene</i> /H2O/MEK	9.09	21/34/44
<i>Cyrene</i> /H2O/Ácido acético	9.37	49/29/23
<i>Cyrene</i> /Ethylene/ Ácido acético	10.73	29/44/27
<i>Cyrene</i> /Etilenoglicol/MEK	10.81	17/56/26
<i>Cyrene</i> /EtOH/Etilenoglicol	10.96	40/15/45
<i>Cyrene</i> /EtOH/Acetona	11.18	7/67/26

Novos testes de solubilidade foram realizados com as misturas otimizadas obtidas, novamente designando pontuações que, somadas às anteriores, foram inseridas no software HSPiP para cálculo de novos parâmetros de Hansen empíricos. Os novos parâmetros calculados foram: $\delta D= 15.54$, $\delta P=17.12$, $\delta H=13.66$, valores mais próximos dos parâmetros teóricos obtidos para a hesperidina. Os solventes e misturas que resultaram em valor de RED menor do que 1 podem ser visualizados na Tabela 4.16. Estes novos parâmetros calculados e suas respectivas distâncias entre solutos e solventes foram levados em consideração para seleção dos meios líquidos utilizados para os ensaios de extração de hesperidina a partir de resíduos de laranja. Os solventes e misturas com menores valores de RED foram testados e comparados entre si.

TABELA 4.16 – Recorte dos solventes com menores valor de RED após teste de solubilidade com misturas binárias e ternárias e novo cálculo dos HSPs empíricos da hesperidina e raio da esfera de Hansen.

Solventes/Misturas	δ_D	δ_P	δ_H	Pont.	RED
62% DMSO-38% etilenoglicol (EG)	17.9	14.4	16.2	1	0.548
DMSO	18.4	16.4	10.2	1	0.599
56% DMSO-44% EtOH	17.3	13.1	14.2	1	0.641
43% DMSO-57% MeOH	16.3	14.1	17.1	1	0.645
DMF	17.4	13.7	11.3	1	0.673
70% <i>Cyrene</i> -30% H ₂ O	17.9	13.5	17.7	2	0.708
50% <i>Cyrene</i> -20% H ₂ O-30% EtOH	17.3	12	17.8	3	0.848*
49% <i>Cyrene</i> -22% Ácido acético-29% H ₂ O	16.9	12.4	18.6	3	0.857*
21% <i>Cyrene</i> -35% H ₂ O-44% MEK	16.4	12.1	18.5	5	0.898*
50% <i>Cyrene</i> -50% EtOH	17.4	10.6	13.3	1	0.927
31% H ₂ O-69% Acetona	15.5	12.2	18.1	5	0.934*
70% <i>Cyrene</i> -30% EtOH	18	11.3	10.8	1	0.946
Anidrido acético	16	11.7	10.2	5	0.971*

* representa solventes erroneamente posicionados dentro ou fora da esfera de Hansen

4.3.3 – Extrações com solventes puros e misturas

Os solventes puros e misturas selecionados foram testados na extração de hesperidina a partir de resíduos (casca) de laranja utilizando a técnica com homogeneizador (EAH) com parâmetros fixos (temperatura ambiente), exceto alguns solventes selecionados que também foram testados em temperatura de 65 °C. As eficiências de extração de hesperidina de acordo com cada meio líquido testado podem ser vistas na Figura 4.44. Como indicado pelos menores valores de RED obtidos (Tabela 4.16), o DMSO e suas misturas com etilenoglicol, etanol e metanol, demonstraram maior eficiência de extração em relação aos outros solventes testados. O DMSO é um solvente aprótico de solubilidade versátil, tendo propriedades parcialmente benignas em termos de recuperabilidade e baixa inflamabilidade, apesar de sua toxicidade e biodegradabilidade moderadas, com riscos quanto a seus produtos de degradação no ambiente²⁰⁸. O *cyrene*, solvente sintetizado a partir de biomassa residuária, detém propriedades semelhantes às observadas no DMSO, com algumas vantagens e desvantagens em termos de toxicidade e persistência no ambiente²⁰⁹. Em misturas binárias com água e ternárias com ácido acético e água, o *cyrene* demonstrou altas eficiências de extração, chegando a níveis comparáveis com o DMSO na extração aquecida em 65 °C. Esta foi realizada para uma avaliação mais detalhada dos parâmetros de extração das misturas de *cyrene* em maiores

temperaturas, que afetam parâmetros físico-químicos do solvente (como a viscosidade).

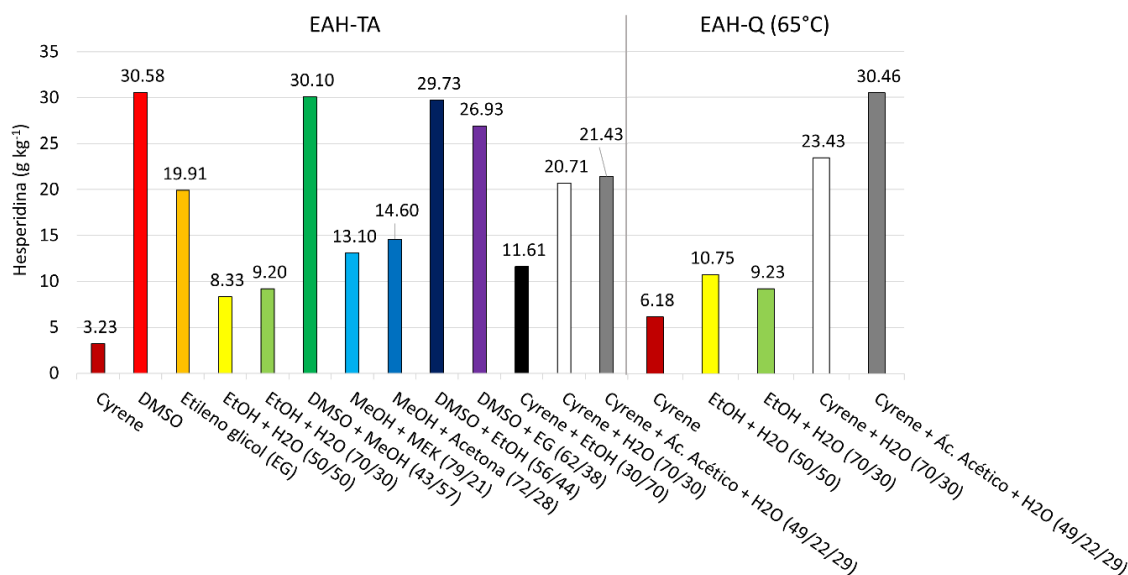


FIGURA 4.44 – Resultados da eficiência de extração de hesperidina a partir de resíduo de laranja em diferentes solventes selecionados de acordo com os HSPs.

Estes solventes foram comparados com mistura de etanol e água (70%) previamente encontradas por otimizar a extração de hesperidina em estudos com solventes etanólicos⁸¹. É possível observar que especialmente para a hesperidina, encontrada em altas concentrações nos resíduos de laranja, a mistura etanólica foi severamente limitada por sua solubilidade na extração deste composto, obtendo eficiência 3 vezes menor em relação à obtida em DMSO. Há de se levar em consideração, entretanto, os fatores sustentáveis e econômicos relacionados aos diferentes solventes, como previamente discutido.

Ao realizar correlação entre os RED calculados e suas respectivas eficiências de extração de hesperidina, é possível observar ligeira tendência de maiores concentrações de hesperidina extraída em solventes com menores valores de RED (que indica maior proximidade soluto-solvente no espaço de Hansen). Como pode ser visto na Figura 4.45, apesar da tendência observada, uma correlação linear fraca (reta pontilhada azul, $R^2=0,4275$) foi verificada quando correlacionados todos os solventes testados (pontos azuis e laranjas). Porém, quando analisados apenas os solventes com RED menores que 1, i.e., os posicionados dentro da esfera de

solubilidade (pontos laranjas), é possível observar uma melhor correlação entre os fatores (reta pontilhada laranja, $R^2=0,8299$). Conclui-se, portanto, que é possível utilizar a ferramenta de HSP como indicativo, ao menos, para triagem e seleção de solventes e misturas de solventes que possam aprimorar a eficiência de extração de compostos bioativos a partir de matrizes vegetais.

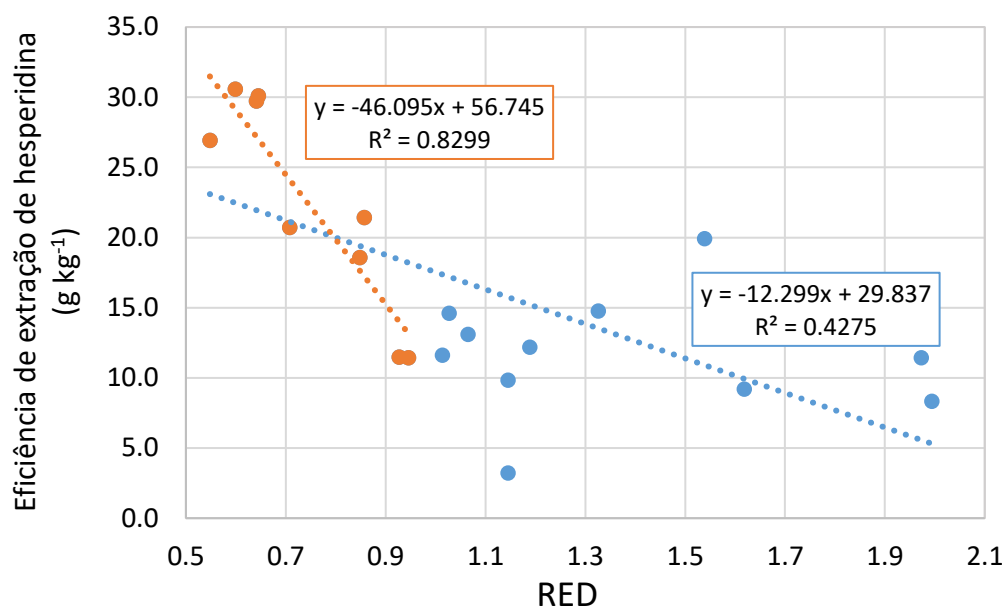


FIGURA 4.45 – Correlação entre eficiência de extração de hesperidina em diferentes solventes e seus respectivos RED em relação à hesperidina.

4.4 – Ensaios biológicos

4.4.1 – Atividade algicida (*R. subcapitata*)

Este ensaio foi realizado com o objetivo inicial de avaliar os efeitos algicidas de extratos de resíduo de manga obtidos com soluções aquosas dos líquidos iônicos em parâmetros ótimos de acetato de colina e [C₈MIm] Cl (método EAH-LIs), em comparação com o extrato etanólico otimizado (EAH-EtOH). Para preservação dos extratos antes dos ensaios com as microalgas, estes foram congelados (-20°C), sendo suas composições de mangiferina e hiperosídeo avaliadas antes do armazenamento e depois de serem descongelados. Para o extrato obtido em acetato de colina (2 mol L⁻¹), uma grande variação foi detectada após descongelamento, com aumento nas áreas das bandas cromatográficas de mangiferina e hiperosídeo, seguido por flutuações significantes após armazenamento em geladeira até 81 dias depois do

descongelamento (Tabela 4.17). Por estas flutuações poderem estar relacionadas com a degradação de mangiferina, hiperosídeo e outros compostos presentes no extrato, não foram realizados testes de atividade algicida no extrato de acetato de colina.

TABELA 4.17 – Estabilidade do extrato de manga em acetato de colina após armazenamento em -20°C.

		Armazenamento em geladeira (4°C)				
		Após extração	Após descongelar	Após esterilização	Após 37 dias	Após 81 dias
Concentração (mg L⁻¹)	Mangiferina	66.9	315.7	267.7	187.2	101.0
	Hiperosídeo	62.2	204.0	136.3	206.8	249.6

Já para os extratos de [C₈MIm] Cl (2 mol L⁻¹) e 70% etanol/água, foram detectadas variações nas concentrações de mangiferina e hiperosídeo dentro do esperado. O extrato etanólico demonstrou estabilidade após congelado por 6 meses em -20 °C e sequencialmente após 3 meses de armazenamento em geladeira (4° C), como pode ser visto nos cromatogramas sobrepostos presentes na Figura 4.46.

Ao iniciar os testes de atividade algicida com os extratos de [C₈MIm] Cl, foi observada atividade relevante no solvente puro (controle), impedindo a avaliação do efeito deste extrato na inibição de crescimento das algas. Portanto, os ensaios seguiram utilizando apenas o extrato etanólico, em diferentes concentrações, bem como os padrões analíticos de mangiferina, hiperosídeo e uma mistura 1:1 destes padrões. Foi possível, então, avaliar a curva dose-dependente de inibição de crescimento das microalgas *R. subcapitata* de acordo com os diferentes tratamentos (Figura 4.47).

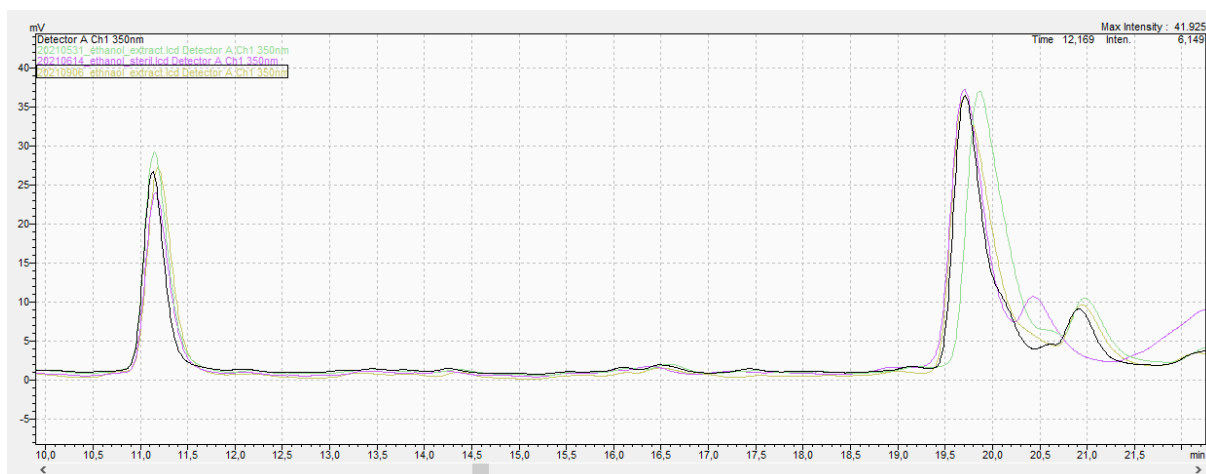


FIGURA 4.46 – Cromatogramas do extrato de manga em etanol/água (70%) após extração (preto); descongelado após 6 meses armazenado em -20°C (verde); após esterilização (rosa); e armazenado em geladeira (4°C) após 3 meses do descongelamento (amarelo). A banda da mangiferina é encontrado no tempo de retenção de 11,2 min e o hiperosídeo é identificado pela banda maior em tempos próximos de 19,5 min.

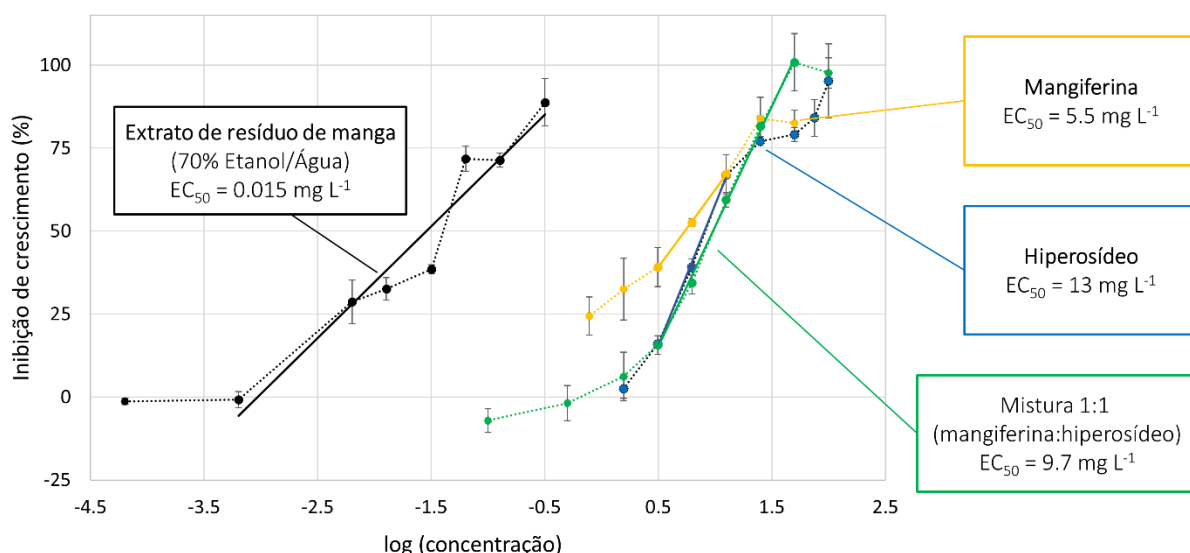


FIGURA 4.47 – Curvas de inibição de crescimento vs. concentração dos padrões analíticos de mangiferina, hiperosídeo, mistura dos padrões 1:1 e extrato etanólico de resíduo de manga.

Neste momento, é imprescindível ressaltar que a avaliação da concentração do extrato etanólico (em preto na Figura 4.47) foi baseada na adição das concentrações de mangiferina e hiperosídeo encontradas no extrato a partir de metodologia analítica apresentada. O objetivo desta prática não é afirmar que a atividade do extrato contra o organismo-alvo é resultante apenas destes analitos, mas sim utilizá-los como marcadores de referência da atividade deste extrato. Adotando-os como referência, é possível avaliar a potencial atividade do extrato contra

diferentes agentes biológicos e escolher a correta concentração do extrato a ser utilizada nesta aplicação. Considerando a variabilidade do perfil químico de extratos obtidos a partir de matérias-primas de diferentes origens, por exemplo, esta estratégia pode ajudar a obter produtos mais estáveis e com atividade padronizada.

Ao avaliar as concentrações inibitórias do extrato em comparação com os padrões analíticos puros e em misturas, observa-se que os marcadores de referência isolados demonstram atividade algicida em concentrações superiores a do extrato, com valores de EC_{50} em $5,5 \text{ mg L}^{-1}$ para a mangiferina e $13,0 \text{ mg L}^{-1}$ para o hiperosídeo. A mistura dos dois analitos resultou em EC_{50} intermediária em $9,7 \text{ mg L}^{-1}$, i.e. nenhuma interação sinérgica entre os dois compostos pôde ser observada nestas condições. Com valor de EC_{50} em menor concentração ($0,015 \text{ mg L}^{-1}$), o extrato etanólico de resíduo de manga demonstrou elevado potencial para uso como produto ou componente ativo em formulações algicidas. A inibição de crescimento máxima ($89 \pm 7\%$) foi encontrada em concentrações relativamente baixas de extrato, de $0,32 \text{ mg L}^{-1}$, isto é, o extrato original foi diluído aproximadamente 400 vezes para gerar este nível de inibição. Isso significa que, para obter este nível de inibição em um corpo hídrico de 1.000 litros (1 m^3), por exemplo, seriam necessários 530 gramas do resíduo seco de manga e 1,8 litros de solvente para a extração, considerando os parâmetros ótimos obtidos no método EAH-EtOH.

A elevada atividade detectada no extrato etanólico, ao comparar com os resultados para os compostos puros e sua mistura, pode estar atrelada à presença de outras substâncias ativas não identificadas nos extratos de resíduo de manga, bem como efeitos sinérgicos entre mangiferina, hiperosídeo e os demais compostos presentes no extrato.

4.4.2 – Atividade inseticida

4.4.2.1 – Lagarta (*H. armigera*)

- a) Avaliação da mortalidade das lagartas de *H. armigera* em extratos de resíduos de manga e goiaba

A atividade inseticida contra lagartas da espécie *H. armigera* foram testadas primeiramente avaliando sua mortalidade em até 10 dias, utilizando extratos diluídos em 1,5x para evitar a toxicidade inerente da composição do solvente (70% de

etanol em água). De acordo com o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, houve diferença estatística entre os tratamentos em todos os períodos de avaliação. Essa constatação pode ser comprovada pelos valores de chi-quadrado (χ^2) e p-valor obtidos nas análises estatísticas (Tabela 4.18).

TABELA 4.18 – Inferências estatísticas de acordo com o teste de Kurskal-Wallis para o primeiro ensaio de atividade inseticida com a lagarta de *H. armigera*.

Avaliação	χ^2 (Kruskal-Wallis)	p-valor
24 horas	17,70	0,0014*
48 horas	21,17	0,0003*
72 horas	23,99	0,0001*
96 horas	23,50	0,0001*
120 horas	23,50	0,0001*
144 horas	26,21	0,0001*
168 horas	26,38	0,0001*
192 horas	26,68	0,0001*
216 horas	27,01	0,0001*
240 horas	27,01	0,0001*

*Diferença significativa (p<0.05)

O inseticida químico comercial utilizado como controle positivo causou mortalidade observada de 100,00%, após 24 horas do início do ensaio. Ao final do período de avaliação, os extratos de manga e goiaba causaram 63,33 e 36,67% de mortalidade, respectivamente, se diferenciando dos controles negativos (seus respectivos solventes). Ainda, vale ressaltar que, a partir das 72 horas, a mortalidade observada nos extratos se diferenciou estatisticamente dos solventes (Tabela 4.19).

TABELA 4.19 – Mortalidade acumulada (%) de lagartas de *H. armigera* expostas a diferentes inseticidas via *diet overlay*. (continua)

Tratamento	24h	48h	72h	96h	120h
Extrato RPG	10,00 b*	26,67 b	36,67 b	36,67 b	36,67 b
Extrato RPM	3,33 b	16,67 bc	26,67 b	30,00 b	30,00 b
Solvente RPG	6,67 b	6,67 c	6,67 c	13,33 c	13,33 c
Solvente RPM	6,67 b	10,00 c	10,00 c	10,00 c	10,00 c
Flubendiamida (controle positivo)	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si para cada tempo pelo teste de Dunn com ajuste de Bonferroni (p<0,05).

TABELA 4.19 (cont.) – Mortalidade acumulada (%) de lagartas de *H. armigera* expostas a diferentes inseticidas via *diet overlay*.

Tratamento	144h	168h	192h	216h	240h
Extrato RPG	36,67 c*	36,67 c	36,67 c	36,67 c	36,67 c
Extrato RPM	50,00 b	53,33 b	56,67 b	63,33 b	63,33 b
Solvente RPG	16,67 d	16,67 d	16,67 d	16,67 d	16,67 d
Solvente RPM	10,00 d	10,00 d	10,00 d	10,00 d	10,00 d
Flubendiamida (controle positivo)	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a

*médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste não-paramétrico de Dunn com ajuste de Bonferroni ($p < 0,05$)

Por ter ocorrido mortalidade nos controles negativos (solventes), houve necessidade de se corrigir a mortalidade nos tratamentos com extratos RPM e RPG. Assim, foi utilizada a fórmula de Schneider-Orelli²¹⁰ para se corrigir a mortalidade observada em cada extrato, utilizando seu respectivo solvente como controle negativo (Figura 4.48).

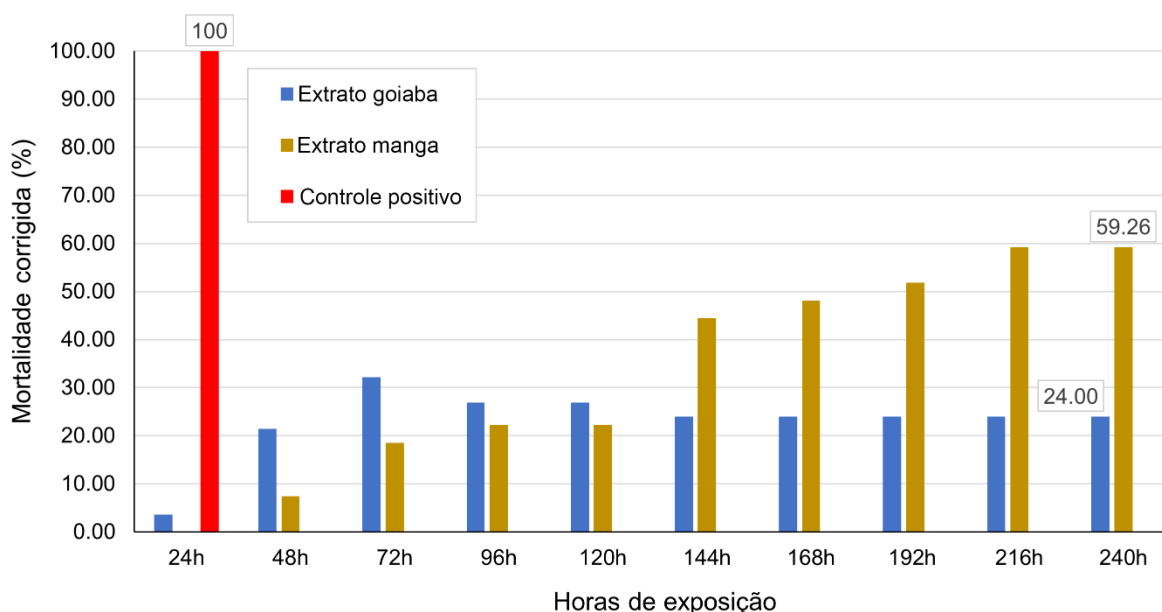


FIGURA 4.48 – Mortalidade acumulada de lagartas de *H. armigera* expostas à dieta artificial coberta por solução inseticida. Tratamentos: extratos de resíduo de manga (amarelo) e goiaba (azul) e controle positivo químico (flubendiamida - vermelho).

Além da mortalidade elevada no extrato de resíduo de manga, também foi observada uma redução no desenvolvimento das lagartas expostas ao tratamento. Na presença do extrato RPM, todas as lagartas sobreviventes não conseguiram se

desenvolver normalmente (Figura 4.49 A), fato que não foi observado nos controles negativos (Figura 4.49 B). Este efeito foi melhor avaliado no próximo ensaio, onde foram avaliados os pesos e diâmetros cefálicos das lagartas sobreviventes após 10 dias em diferentes concentrações do extrato RPM.

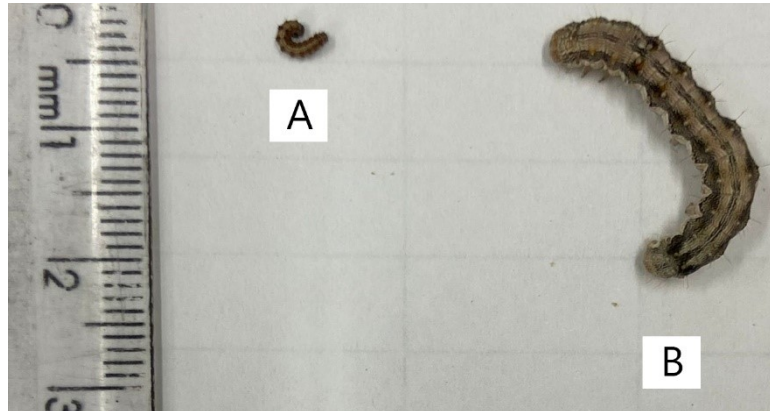


FIGURA 4.49 – Inibição de crescimento causada pelo tratamento extrato de manga em larvas de *H. armigera* (A), em comparação ao tratamento com o respectivo solvente (B), ambos após 120 horas de exposição.

b) Avaliação da inibição de crescimento das lagartas de *H. armigera* em extratos de resíduo de manga

Para avaliação da inibição do crescimento das lagartas, foi utilizado o extrato de manga previamente diluído 1,5x e suas diluições realizadas a partir desta solução. De acordo com o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, houve diferença em relação à mortalidade entre os tratamentos, em todos os períodos de avaliação a partir das 72 horas após a aplicação dos inseticidas. Essa constatação pode ser comprovada pelos valores de chi-quadrado (χ^2) e p-valor obtidos nas análises estatísticas (Tabela 4.20).

TABELA 4.20 – Inferências estatísticas de acordo com o teste de Kurskal-Wallis para o ensaio de atividade inseticida e de inibição de crescimento com a lagarta de *H. armigera*.

Avaliação	χ^2 (Kruskal-Wallis)	p-valor
24 horas	8,22	0,22
48 horas	7,42	0,38
72 horas	15,66	0,02*
96 horas	16,42	0,02*
120 horas	15,40	0,03*
144 horas	15,85	0,02*
168 horas	15,85	0,02*
192 horas	15,85	0,02*
216 horas	14,68	0,04*
240 horas	16,33	0,02*

*Diferença significativa ($p < 0.05$)

O tratamento controle negativo não causou mortalidade nos organismos testados, portanto não houve necessidade de se aplicar cálculos de correção de mortalidade nos demais tratamentos (Tabela 4.21). O extrato RPM em sua maior concentração ($153,4 \text{ mg L}^{-1}$) causou mortalidade em 13,33% das lagartas, no entanto houve redução significativa no desenvolvimento de todos indivíduos sobreviventes. O único tratamento que se diferenciou do controle (água destilada) foi o extrato RPM com 50% de concentração ($76,7 \text{ mg L}^{-1}$), causando mortalidade em 16,67% das lagartas ao final do período de avaliação. Nota-se que houve mortalidade significativamente menor após os 10 dias de exposição quando em comparação ao ensaio anterior, avaliando a mesma dosagem utilizada ($153,4 \text{ mg L}^{-1}$). Esta diminuição na mortalidade pode estar relacionada à degradação do extrato, que foi armazenado nas mesmas condições do experimento ($25 \text{ }^\circ\text{C}$, fotofase de 14 horas), em frasco âmbar.

TABELA 4.21 – Mortalidade acumulada (%) de lagartas de *H. armigera* expostas a diferentes inseticidas via *diet overlay* no ensaio de mortalidade e inibição de crescimento. (continua)

Tratamento	24h	48h	72h	96h	120h
Extrato RPM ($153,4 \text{ mg L}^{-1}$)	3,33 ^{ns}	3,33 ^{ns}	3,33 ab	3,33 ab	6,67 ab
Extrato RPM ($76,7 \text{ mg L}^{-1}$)	6,67	10,00	16,67 a	16,67 a	16,67 a
Extrato RPM ($30,7 \text{ mg L}^{-1}$)	0,00	3,33	3,33 ab	3,33 ab	3,33 ab
Extrato RPM ($15,3 \text{ mg L}^{-1}$)	0,00	0,00	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Extrato RPM ($7,7 \text{ mg L}^{-1}$)	3,33	3,33	3,33 ab	3,33 ab	3,33 ab
Extrato RPM ($5,1 \text{ mg L}^{-1}$)	3,33	6,67	6,67 ab	6,67 ab	6,67 ab
Solvente RPM	6,67	6,67	6,67 ab	10,00 ab	10,00 ab
Água destilada	0,00	0,00	0,00 b	0,00	0,00 b

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si para cada tempo pelo teste de Dunn com ajuste de Bonferroni ($p < 0,05$); ns = não significativo

TABELA 4.21 (cont.) – Mortalidade acumulada (%) de lagartas de *H. armigera* expostas a diferentes inseticidas via *diet overlay* no ensaio de mortalidade e inibição de crescimento.

Tratamento	144h	168h	192h	216h	240h
Extrato RPM (153,4 mg L ⁻¹)	10,00 ab	10,00 ab	10,00 ab	10,00 ab	13,33 ab
Extrato RPM (76,7 mg L ⁻¹)	16,67 a	16,67 a	16,67 a	16,67 a	16,67 a
Extrato RPM (30,7 mg L ⁻¹)	3,33 ab	3,33 ab	3,33 ab	3,33 ab	3,33 ab
Extrato RPM (15,3 mg L ⁻¹)	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Extrato RPM (7,7 mg L ⁻¹)	3,33 ab	3,33 ab	3,33 ab	6,67 ab	10,00 ab
Extrato RPM (5,1 mg L ⁻¹)	6,67 ab	6,67 ab	6,67 ab	6,67 ab	6,67 ab
Solvente RPM	10,00 ab	10,00 ab	10,00 ab	10,00 ab	10,00 ab
Água destilada	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b

*médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste não-paramétrico de Dunn com ajuste de Bonferroni ($p < 0,05$)

Em função da redução no desenvolvimento dos insetos observada em ensaios anteriores e nesse ensaio, parâmetros morfológicos das lagartas sobreviventes foram analisados (Tabela 4.22). Mesmo com a mortalidade reduzida, foi possível observar um evidente efeito de inibição no crescimento das lagartas, seja pela análise do diâmetro da cápsula cefálica, seja por seu peso, já que em ambas foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,001$). Parâmetro padronizado para avaliação das fases larvais, o diâmetro da cápsula cefálica evidenciou a inibição do crescimento causada pelo extrato RPM de forma mais clara, sendo possível observar um valor de diâmetro que impediu um maior crescimento das larvas nas concentrações entre 153,4 e 30,7 mg L⁻¹. O diâmetro obtido nestas concentrações (cerca de 0,60 mm) é equivalente às fases larvais entre 2º e 3º instares (0,46 - 0,72 mm), enquanto o controle negativo e o solvente RPM chegaram a níveis relativos à última fase larval após 10 dias (6º instar, 2,87 mm), segundo Queiroz-Santos, Casagrande, Specht (2018)²¹¹. Os resultados sugerem, além da toxicidade por ingestão da dieta contendo o extrato, também o retardamento ou inibição do crescimento das larvas, podendo também estar relacionados a efeitos antialimentares, necessitando estudos mais aprofundados para identificar o modo de ação do extrato. A inibição e o prolongamento da fase larval de *H. armigera* auxilia na inviabilização de infestações causadas por este organismo em campo^{212,213}, podendo este extrato potencialmente integrar formulações inseticidas, após os devidos estudos de viabilidade.

TABELA 4.22 – Parâmetros morfológicos de lagartas de *H. armigera* expostas a diferentes soluções de extrato, solvente e controle via *diet overlay*

Tratamento	Diâmetro da cápsula cefálica (mm) [Inibição (%)]	Peso (mg) [Inibição (%)]
Extrato RPM (153,4 mg L ⁻¹)	0,60 ± 0,04 a [73,3]	0,06 ± 0,006 a [97,3]
Extrato RPM (76,7 mg L ⁻¹)	0,60 ± 0,03 a [73,3]	0,03 ± 0,006 a [98,6]
Extrato RPM (30,7 mg L ⁻¹)	0,67 ± 0,04 a [70,2]	0,07 ± 0,02 a [96,8]
Extrato RPM (15,3 mg L ⁻¹)	1,09 ± 0,12 b [51,6]	0,29 ± 0,11 a [86,9]
Extrato RPM (7,7 mg L ⁻¹)	1,45 ± 0,13 c [35,6]	1,05 ± 0,39 a [52,5]
Extrato RPM (5,1 mg L ⁻¹)	2,23 ± 0,13 d [0,9]	3,03 ± 0,56 b [-37,1]
Solvente RPM	2,27 ± 0,08 d	2,34 ± 0,49 b
Água destilada	2,25 ± 0,09 d	2,21 ± 0,39 b

*médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$)

Para determinação da dose efetiva para redução do desenvolvimento de 50% da população (EC₅₀), primeiramente foi calculada a porcentagem de inibição para cada um dos parâmetros em relação aos valores observados no tratamento controle (água destilada). Posteriormente, os valores de inibição foram confrontados com as respectivas concentrações do extrato RPM (em escala logarítmica), o que permitiu calcular uma regressão linear para estimar os valores de EC₅₀. Para o parâmetro diâmetro de cápsula cefálica, a regressão linear apresentou um comportamento aceitável ($R^2=0,99$) (Figura 4.50).

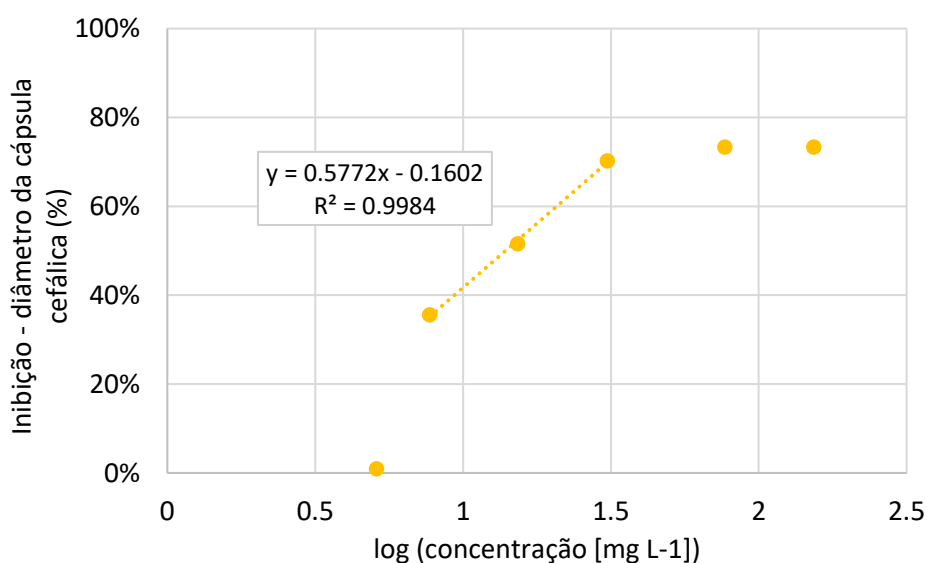


FIGURA 4.50 – Inibição percentual do diâmetro da cápsula cefálica de lagartas de *H. armigera* expostas a dieta artificial coberta por solução inseticida à base do extrato RPM em diferentes concentrações (soma das concentrações de mangiferina e hiperosídeo).

Desta forma, foi possível estimar a concentração do extrato RPM que causa 50% de inibição do crescimento do diâmetro de cápsula cefálica de lagartas de *H. armigera* (EC₅₀) em 13,93 mg L⁻¹, ou uma diluição de 11x (9,1%_{v/v}) do extrato mais concentrado utilizado neste ensaio ou 16,5x (6,1%_{v/v}) do extrato etanólico bruto. A mesma abordagem foi testada para o parâmetro peso de lagartas, que resultou em uma regressão linear com R²=0,91 (Figura 4.51).

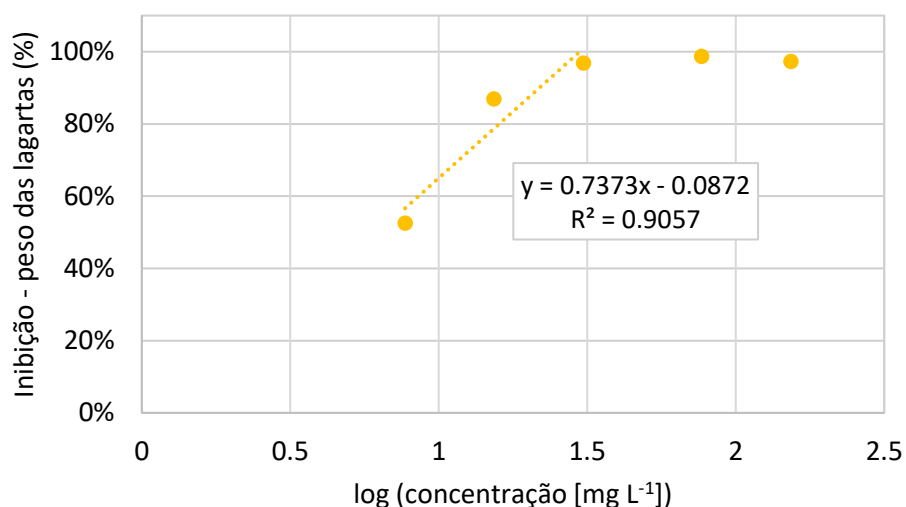


FIGURA 4.51 – Inibição percentual do peso de lagartas de *Helicoverpa armigera* expostas a dieta artificial coberta por solução inseticida à base do extrato RPM em diferentes concentrações.

Com a equação da regressão linear, foi possível estimar a concentração EC₅₀ para a inibição do peso de lagartas de *H. armigera*, chegando ao valor de 6,25 mg L⁻¹, ou uma diluição de 24,5x (4%_{v/v}) do extrato mais concentrado utilizado neste ensaio ou 36,8x (2,7%_{v/v}) do extrato etanólico bruto.

Por utilizar fatores diferentes de concentração para avaliar os parâmetros de inibição, a comparação com valores da literatura é dificultada, sem mencionar as diferentes metodologias para determinação das atividades inseticidas. Kamaraj, Rahuman, Bagavan (2008)²¹⁴ determinaram as concentrações letais de extratos de cascas dos frutos, folhas e flores de 4 diferentes plantas contra *H. armigera*, obtendo melhores resultados com extratos de clorofórmio a partir de casca de laranja, com concentração letal de 50% das larvas (LC₅₀) em 65,10 ppm (massa de extrato sólido seco/volume de solvente). Usando parâmetros semelhantes, Baskar et al. (2009)²¹⁵ chegou ao LC₅₀ de 384,57 ppm para a mortalidade das larvas de *H.*

armigera com extratos de hexano da planta *Atalantia monophylla*. Extratos de sementes e folhas de neem (*Azadirachta indica*) também apresentaram efeitos de mortalidade, inibição no crescimento e prolongamento da etapa larval, tendo maior efetividade em concentração de 1%_{m/v} do extrato bruto sólido da semente obtido a partir do extrato em clorofórmio/metanol²¹⁶. Estudos anteriores já haviam atestado o efeito no comportamento alimentar causado por extratos de neem, influenciando a duração e viabilidade das larvas de *H. armigera*²¹⁷.

4.4.2.2 – Percevejo-marrom (*E. heros*)

Assim como no método anterior, não houve diferença entre os tratamentos em todos os períodos de avaliação de acordo com o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (Tabela 4.23).

TABELA 4.23 – Inferências estatísticas de acordo com o teste de Kurskal-Wallis para o ensaio de atividade inseticida com ninfas de *E. heros*.

Avaliação	χ^2 (Kruskal-Wallis)	p-valor
24 horas	20,13	0,0005*
48 horas	20,72	0,0004*
72 horas	21,14	0,0003*
96 horas	19,55	0,0006*
120 horas	15,60	0,0036*
144 horas	15,57	0,0036*
168 horas	15,03	0,0046*
192 horas	15,03	0,0046*
216 horas	14,90	0,0049*
240 horas	15,72	0,0034*

*Diferença significativa (p<0.05)

O inseticida químico comercial utilizado como controle positivo causou mortalidade observada de 100,00% após 24 horas do início do ensaio. Ao final do período de avaliação, os extratos de goiaba e manga causaram 73,33% e 60,00% de mortalidade observada, respectivamente. Porém, os respectivos solventes dos extratos de goiaba e manga causaram 46,67% e 36,67% de mortalidade observada, respectivamente, mostrando que podem ter contribuído para a mortalidade encontrada nos extratos (Tabela 4.24). Por conta disso, ao final do período de avaliação, não houve diferença estatística entre valores de mortalidade observados nos extratos e nos solventes em ambas situações.

TABELA 4.24 – Mortalidade acumulada (%) de ninfas de *E. heros* expostas a diferentes inseticidas via oral e ingestão, concomitantemente. (continua)

Tratamento	24h	48h	72h	96h	120h
Extrato RPG	20,00 b*	40,00 ab	50,00 b	53,33 ab	60,00 ab
Solvente RPG	10,00 b	13,33 bc	13,33 c	23,33 bc	36,67 b
Extrato RPM	3,33 b	13,33 bc	26,67 bc	26,67 bc	30,00 b
Solvente RPM	0,00 b	3,33 c	3,33 c	6,67 c	16,67 b
Tiametoxan+lambda-cialotrina (controle positivo)	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunn com ajuste de Bonferroni ($p < 0,05$)

TABELA 4.21 (cont.) – Mortalidade acumulada (%) de ninfas de *E. heros* expostas a diferentes inseticidas via oral e ingestão, concomitantemente.

Tratamento	144h	168h	192h	216h	240h
Extrato RPG	60,00 ab*	66,67 ab	66,67 ab	70,00 ab	73,33 ab
Solvente RPG	40,00 b	46,67 b	46,67 b	46,67 b	46,67 b
Extrato RPM	30,00 b	33,33 b	33,33 b	46,67 b	60,00 b
Solvente RPM	20,00 b	30,00 b	30,00 b	33,33 b	36,67 b
Tiametoxan+lambda-cialotrina (controle positivo)	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunn com ajuste de Bonferroni ($p < 0,05$)

A mortalidade dos extratos foi corrigida de acordo com a mortalidade encontrada nos respectivos solventes utilizando a fórmula de Schneider-Orelli²¹⁰. As mortalidades corrigidas chegaram a 43,75% e 36,84% para os extratos de goiaba e manga, respectivamente (Figura 4.52).

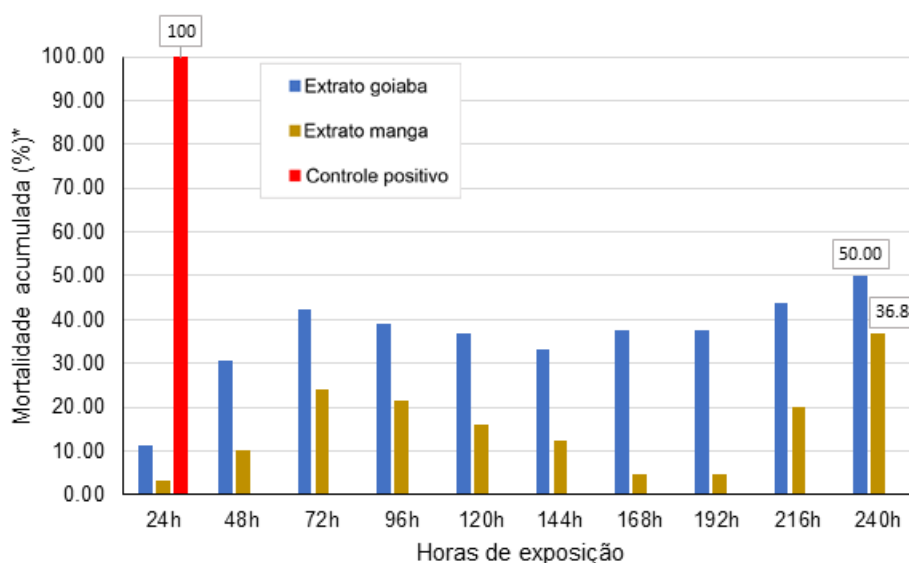


FIGURA 4.52 – Mortalidade acumulada de ninfas de *E. heros* expostas a dieta natural e papel filtro impregnados em solução inseticida. Tratamentos: Extratos de resíduo de manga (amarelo) e goiaba (azul) e controle químico (tiametoxam + lambda-cialotrina - vermelho). *Mortalidade corrigida por Schneider-Orelli (1981)

Para verificação da qualidade do ensaio, foi utilizado um tratamento controle negativo, composto por água destilada, sob as mesmas condições. Esse tratamento não foi incluído nas análises estatísticas, em função de seu caráter de controle de qualidade. A mortalidade observada no controle negativo não ultrapassou 20%, valor aceitável em testes de eficácia de inseticidas.

4.4.3 – Atividade fitotóxica (*G. max*)

Os resultados dos efeitos fitotóxicos dos extratos botânicos e seus solventes em plantas de soja encontram-se detalhados na Tabela 4.25 e Tabela 4.26. Ao se comparar os resultados das pulverizações dos tratamentos com extratos e solventes com o controle (água), pode-se verificar que somente o extrato RPG e o solvente RPG apresentaram notas médias de fitotoxicidade estatisticamente diferentes (Tabela 4.25). Isto se deu porque os tratamentos à base de extrato de goiaba (RPG) ocasionaram um elevado grau de efeito fitotóxico, com plantas predominantemente classificadas nas escalas 3 e 4, que compreende de acentuada necrose em várias áreas nas folhas a murcha total da planta (Tabela 4.26).

TABELA 4.25 – Valores médios das notas aplicadas (0 a 4) às plantas de soja com lesões de fitotoxicidade causadas por diferentes tratamentos botânicos.

Produto	Nota (Média)
Extrato RPG	3,50 a*
Solvente RPG	3,17 a
Extrato RPM	0,07 b
Solvente RPM	0,00 b
Controle (Água)	0,00 b
GL	4
χ^2	136,76
p	$\leq 0,001$

*Valores médios seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste não-paramétrico de Dunn com correção de Bonferroni ($p < 0,05$)

TABELA 4.26 – Frequência de plantas de soja classificadas em cada escala de nota de fitotoxicidade causadas por diferentes tratamentos botânicos.

Produto	Frequência (%)/(Notas)				
	(0)*	(1)	(2)	(3)	(4)
Extrato RPG	0,00	0,00	6,67	36,67	56,67
Solvente RPG	0,00	0,00	30,00	23,33	43,33
Extrato RPM	93,33	6,67	0,00	0,00	0,00
Solvente RPM	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Controle (Água)	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00

*Nota "0" (0%)= ausência de fitotoxicidade nas folhas; Nota "1" (1 a 25%)= clorose a início de necrose nas folhas; Nota "2" (26 a 50%)= necrose em algumas áreas nas folhas; Nota "3" (51 a 75%)= acentuada necrose em várias áreas nas folhas; Nota "4" (76 a 100%)= murcha total da planta.

Os tratamentos à base do resíduo de manga (RPM) não apresentaram toxicidade significativa às folhas de soja. Observou-se que estes tratamentos tiveram notas médias variando de 0 a 0,07, não diferindo estatisticamente do controle (Tabela 4.25). Em termos de frequência de plantas classificadas em notas de fitotoxicidade, os tratamentos com o extrato RPM e solvente RPM apresentaram 93 e 100% das plantas com folhas saudias (escala 0, Tabela 4.26). Na Figura 4.53 é possível visualizar alguns exemplos do grau de fitotoxicidade resultante da aplicação dos diferentes extratos e solventes botânicos em folhas de soja.

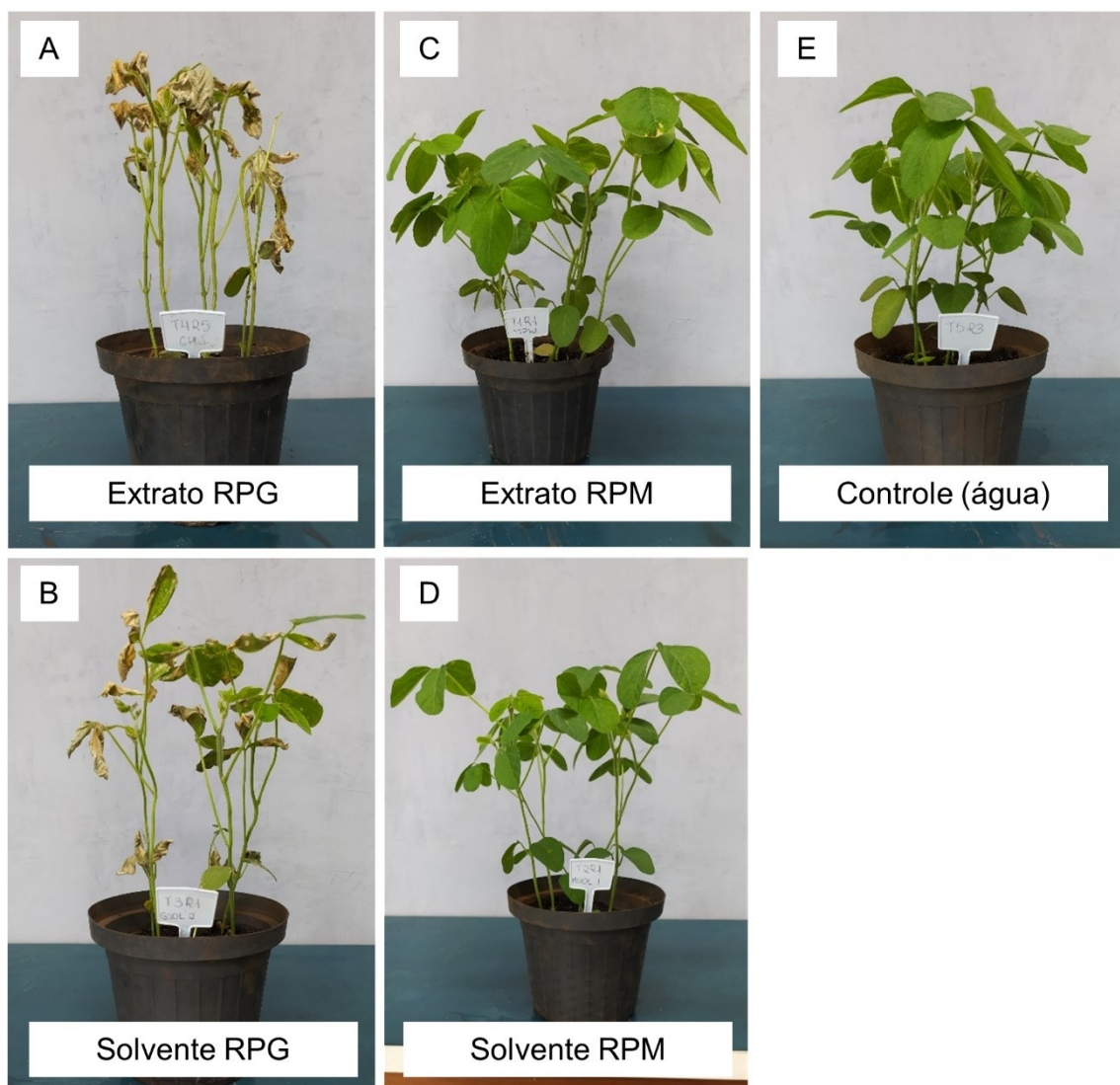


FIGURA 4.53 – Visão geral do bioensaio de efeito fitotóxico de compostos botânicos sobre plantas de soja. A) Extrato RPG, representando a nota 4 (murcha total das plantas); B) Solvente do extrato RPG, representando as notas 3 e 4 (acentuada necrose em várias áreas nas folhas das plantas e murcha total das plantas); C) Extrato RPM; D) Solvente RPM; E) Controle (Água). D) e E) sem fitotoxicidade (nota 0). O círculo vermelho em C) demonstra uma pequena lesão observada em algumas das plantas que receberam o extrato RPM (nota 1=clorose a início de necrose).

O efeito do solvente presente no extrato RPG é evidente na fitotoxicidade das plantas, cuja nota média foi estatisticamente equivalente à nota do próprio extrato RPG. Isto pode indicar um efeito fitotóxico de um dos componentes presentes no solvente, especialmente o cloreto de sódio, resultante da reação de neutralização do ácido clorídrico com bicarbonato de sódio, etapa realizada após a extração. A toxicidade observada neste tratamento não foi encontrada em soluções de apenas etanol e água (solvente RPM), cujos valores foram estatisticamente iguais ao controle negativo, o que evidencia o efeito da presença de NaCl no solvente RPG. Em proporção estequiométrica, a concentração do sal no solvente é de 58,4 g L⁻¹, cujo alto valor gera toxicidade às plantas, especialmente por stress osmótico na superfície das folhas e toxicidade iônica²¹⁸. Isto demonstra uma necessidade de adaptação da metodologia de processamento do extrato RPG para aplicação como produto inseticida, adicionando uma nova etapa de separação do extrato dos demais componentes fitotóxicos, ou então o desenvolvimento de um novo procedimento sem a presença de ácido clorídrico e sua consequente neutralização. Esta adaptação deve ser acompanhada, então, de novos ensaios de avaliação da atividade inseticida deste extrato e seus principais componentes.

O extrato proveniente de resíduos de manga (RPM) também não demonstrou toxicidade relevante à planta de soja, com nota média equivalente ao controle negativo e ao seu solvente. Desta forma, de acordo com o teste com organismo padrão para avaliação de sua fitotoxicidade, o extrato RPM pode ser considerado para investigação de aplicação segura como componente ativo em formulações inseticidas, dada a seletividade de seus efeitos em relação aos insetos testados.

5 – Conclusões e perspectivas futuras

De acordo com os objetivos propostos, a partir deste trabalho foi possível avaliar formas diferentes de obter e otimizar métodos de extração mais verdes, compondo metodologias sustentáveis, de compostos bioativos a partir de resíduos do processamento de três frutas produzidas no Brasil, analisando marcadores de referência da atividade biológica presentes nos extratos.

Para o resíduo de manga, fazendo uma rápida análise comparativa entre os pontos ótimos calculados a partir dos modelos polinomiais de cada técnica de extração, observou-se que a Dispersão de Matriz em Fase Sólida (DMFS) foi mais eficiente na extração de mangiferina e hiperosídeo, apesar de tempos mais longos de extração. A Extração Assistida por Homogeneizador (EAH) se mostrou uma técnica de eficiência comparável com a DMFS, porém com a vantagem de tempos de extração reduzidos e baixo consumo energético, além de não utilizar de outros materiais no procedimento. Desta forma, a EAH foi selecionada para utilização nas extrações realizadas com resíduos de manga em prosseguimento com os testes de atividade biológica e deve ser estudada para escalas superiores, avaliando sua eficiência em níveis piloto e industrial.

Quanto ao uso de soluções aquosas de líquidos iônicos, as extrações realizadas com ambos LIs estudados obtiveram melhores eficiências quando em concentrações maiores (2 mol L^{-1}), com o $[\text{C}_8\text{MIm}]\text{Cl}$ superior em relação ao acetato de colina. Ainda assim, em comparação com a mistura etanólica previamente otimizada, concluiu-se que o ganho de eficiência de extração não é suficiente para suprir as desvantagens do LI de imidazólio em termos de toxicidade, persistência e dificuldade de recuperação.

Nas extrações realizadas com o resíduo de goiaba, foi observado um aumento na eficiência com soluções ácidas, na ordem de 2 vezes para a quercetina, o que então indicou a possibilidade de otimização do método de Extração Assistida por Ultrassom (EAU). A otimização resultou em eficiências superiores em comparação com os melhores resultados sem os ácidos e em condições mais brandas comparadas ao estudo temporal ($0,50 - 0,78 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl).

O estudo com a casca de laranja indicou potencial no uso dos parâmetros de Hansen (HSPs) como método *in silico* para determinação da solubilidade – e conseqüente eficiência de extração – de compostos bioativos em matrizes vegetais. Apesar de não demonstrar uma relação direta entre os parâmetros de proximidade (RED e R_a) com a eficiência de extração, foi possível observar uma tendência nesta correlação, especialmente entre solventes e misturas com maior afinidade com o soluto. Portanto, o uso dos HSPs se mostrou uma ferramenta interessante de melhora nos parâmetros de extração, encontrando misturas não usuais de solventes (por exemplo: *cyrene*, ácido acético e água) que possam ter vantagens técnicas em relação aos solventes menos eficientes (como, no caso, o etanol) ou os solventes envolvidos com problemáticas ambientais (como o DMSO).

A comparação entre amostras provenientes de agricultura convencional e orgânica não mostrou diferenças significativas na presença dos marcadores de referência dos resíduos de manga, comparando as somas de mangiferina e hiperosídeo quantificadas. O perfil químico também foi semelhante, apresentando poucas diferenças entre os compostos detectáveis por absorção UV, o que também foi observado entre as amostras de resíduo de goiaba. Apesar disso, uma diferença significativa foi detectada na extração de vanilina, que também se refletiu na soma com quercetina, quantificada em concentrações maiores no resíduo de goiaba proveniente de produção convencional. Visto que muitas variáveis podem afetar a concentração dos analitos e o perfil químico em plantas, mais amostras são necessárias para indicação de tendências nas concentrações dos bioativos em frações residuárias das frutas testadas.

Por ter sido possível obter extratos de resíduo de manga e goiaba com metodologias simples e de baixo custo energético, como a EAH e a EAU, e obtidos os parâmetros que otimizem a extração dos marcadores de referência bioativos, foi proposta a utilização destes extratos etanólicos de forma direta em ensaios de atividade algicida. A atividade do extrato proveniente da manga contra microalgas revelou valores promissores de EC_{50} , na ordem de $0,015 \text{ mg L}^{-1}$ de mangiferina e hiperosídeo.

Observado este efeito, também foram realizados ensaios inseticidas em lagartas de *H. armigera* e ninfas de *E. heros*, tanto para os extratos de resíduo de manga quanto de goiaba. Os ensaios com o percevejo-marrom não resultaram em

dados significativos, considerados os níveis de mortalidade encontrados nos solventes. Já para as lagartas da espécie *H. armigera*, o extrato proveniente de resíduos de manga apresentou mortalidade estatisticamente relevante, chegando próximo de 60% após 10 dias, além de serem observadas inibições no crescimento das lagartas, que foram quantificadas em ensaio posterior. Em concentração máxima, o extrato chegou a 73,3% de inibição do crescimento do diâmetro da cápsula cefálica das larvas e 98,6% do peso. No ensaio de atividade fitotóxica, o extrato de resíduo de manga apresentou pouca toxicidade às plantas de soja (*G. max*), o que revela a seletividade deste extrato quanto à atividade inseticida, sem detrimento para a planta.

As principais perspectivas derivadas deste trabalho de doutorado se dão na avaliação dos potenciais dos extratos de resíduos de manga e goiaba como agentes ativos em formulações biopesticidas. O método de obtenção do extrato proveniente de goiaba obtido a partir da técnica de ultrassom com soluções etanólicas ácidas deve ser adaptado para separação do cloreto de sódio gerado após reação de neutralização do ácido clorídrico, uma vez que o extrato se mostrou tóxico às plantas de soja. Essa adaptação é importante pois o extrato apresentou potencial atividade contra os insetos testados. Outros tipos de extrações, sem a presença de ácido, também podem ser testados a fim de obter extratos com eficiências de extração dos marcadores de referência comparáveis às obtidas no método proposto.

O extrato etanólico derivado dos resíduos de manga apresentou parâmetros iniciais relevantes quanto ao seu uso direto em formulações pesticidas, tanto contra algas quanto insetos. Estudos de estabilidade, persistência, biodegradabilidade e atividade contra diversos organismos, entre outros, são necessários para a melhor avaliação da viabilidade deste extrato em aplicações como biopesticida. Além disso, a escalabilidade dos métodos de extração deve ser melhor estudada, garantido que parâmetros seguros e eficientes podem ser utilizados no processamento em níveis piloto e industrial. Por estes fatores, o condicionamento, processamento e aplicação do produto de extrato etanólico de resíduos de processamento de manga – desenvolvidos no decorrer deste doutorado – são objetos de aplicação de patente, em atual fase de redação do pedido, motivo pelo qual esta tese e sua defesa estão sendo protegidos.

O uso de resíduos provenientes da agroindústria e da indústria de alimentos, aliado à inegociável utilização de metodologias mais verdes, sustentáveis

e econômicas, foi tomado como base para obtenção de produtos de alto valor agregado ao aproveitar o potencial químico inerente às plantas em formulações bioativas. O uso direto dos extratos etanólicos, evitando demais etapas de separação, custosas em termos de materiais e energia, também se apresenta como grande vantagem estratégica nas esferas econômica e ambiental. Já o uso desses extratos no controle de pragas, em substituição aos pesticidas convencionais, fecha o ciclo de volta à plantação e demonstra o emprego dos conceitos de sustentabilidade e circularidade em todas as etapas desta pesquisa, fator imprescindível para alcançarmos um futuro viável.

6 – Referências

1. ZUIN, V. G.; SEGATTO, M. L.; RAMIN, L. Z. "Green Chemistry in Analytical Chemistry". IN: MEYERS, R. (org.). *Encyclopedia of Sustainability Science and Technology*. New York, NY: Springer New York, 2018.
2. ZUIN, V. G.; SEGATTO, M. L.; RAMIN, L. Z. "Plants as resources for organic molecules: Facing the green and sustainable future today". *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, **9**, p. 1–7, fev. 2018.
3. ZUIN, V. G.; STAHL, A. M.; ZANOTTI, K.; SEGATTO, M. L. "Green and sustainable chemistry in Latin America: Which type of research is going on? And for what?". *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, **25**, p. 100379, out. 2020.
4. SCHNARR, L.; SEGATTO, M. L.; OLSSON, O.; ZUIN, V. G.; KÜMMERER, K. "Flavonoids as biopesticides – Systematic assessment of sources, structures, activities and environmental fate". *Sci. Total Environ.*, p. 153781, fev. 2022.
5. LANCASTER, M. "Principles and concepts in green chemistry". IN: LANCASTER, M. (org.). *Green Chemistry : An Introductory Text*. p. 1–20.
6. SIDKAR, S. K. "Sustainable Development and Sustainability Metrics". *AIChE J.*, **49** (8), p. 1928–1932, 2003.
7. ANASTAS, P. T. "Green Chemistry and the Role of Analytical Methodology Development". *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **29** (3), p. 167–175, 1999.
8. ANASTAS, P. T.; EGHBALI, N. "Green Chemistry: Principles and Practice". *Chem. Soc. Rev.*, **39** (1), p. 301–312, 2010.
9. ZUIN, V. G.; KÜMMERER, K. "Chemistry and materials science for a sustainable circular polymeric economy". *Nat. Rev. Mater.*, **7** (2), p. 76–78, 25 fev. 2022.
10. CHAMAS, A.; MOON, H.; ZHENG, J.; QIU, Y.; TABASSUM, T.; JANG, J. H.; ABU-OMAR, M.; SCOTT, S. L.; SUH, S. "Degradation Rates of Plastics in the Environment". *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **8** (9), p. 3494–3511, 9 mar. 2020.
11. KÜMMERER, K. "Sustainable Chemistry: A Future Guiding Principle". *Angew. Chemie Int. Ed.*, **56** (52), p. 16420–16421, 22 dez. 2017.

12. KÜMMERER, K. "Benign by Design". IN: SUMMERTON, L. et al. (org.). Green and Sustainable Medicinal Chemistry: Methods, Tools and Strategies for the 21st Century Pharmaceutical Industry. Green Chemistry Series. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2016. p. 73–81.
13. KÜMMERER, K.; CLARK, J. H.; ZUIN, V. G. "Rethinking chemistry for a circular economy". Science (80-.), 367 (6476), p. 369–370, 24 jan. 2020.
14. ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). "Agenda 2030". Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/pos2015/agenda2030/>>. Acesso em: 10 fev. 2022.
15. EESC. "Closing the loop - An EU action plan for the Circular Economy". Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:52015DC0614>>. Acesso em: 9 fev. 2022.
16. CLARK, J. H.; FARMER, T. J.; HERRERO-DAVILA, L.; SHERWOOD, J. "Circular economy design considerations for research and process development in the chemical sciences". Green Chem., 18 (14), p. 3914–3934, 2016.
17. ZUIN, V. G. "Circularity in green chemical products, processes and services: Innovative routes based on integrated eco-design and solution systems". Curr. Opin. Green Sustain. Chem., 2, p. 40–44, out. 2016.
18. CHERUBINI, F. "The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals". Energy Convers. Manag., 51 (7), p. 1412–1421, jul. 2010.
19. BRACMORT, K. "Biomass: Comparison of Definitions in Legislation". Disponível em: <https://digital.library.unt.edu/ark:/67531/metadc271997/m1/1/high_res_d/R40529_2013Nov26.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2022.
20. DUGMORE, T. I. J.; CLARK, J. H.; BUSTAMANTE, J.; HOUGHTON, J. A.; MATHARU, A. S. "Valorisation of Biowastes for the Production of Green Materials Using Chemical Methods". Top. Curr. Chem., 375 (46), p. 1–49, 2017.
21. GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. "The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices". TrAC Trends Anal. Chem., 50, p. 78–84, out. 2013.

22. ZUIN, V. G. "Considerações sobre o Desenvolvimento de Metodologias Analíticas Verdes: Preparo de Amostras". IN: CORREA, A. G.; ZUIN, V. G. (org.). *Química Verde: Fundamentos e Aplicações*. 1. ed. São Carlos: EDUFSCar, 2009. p. 135–150.
23. ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. "Green Analytical Chemistry". *TrAC Trends Anal. Chem.*, 27 (6), p. 497–511, jun. 2008.
24. TOBISZEWSKI, M.; MARĆ, M.; GAŁUSZKA, A.; NAMIEŚNIK, J. "Green Chemistry Metrics with Special Reference to Green Analytical Chemistry". *Molecules*, 20 (12), p. 10928–10946, 12 jun. 2015.
25. OTTO, M. *Chemometrics: Statistics And Computer Application In Analytical Chemistry*. 3. ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, 2017.
26. GEMPERLINE, P. J. "Introduction to chemometrics". IN: GEMPERLINE, P. J. (org.). *Practical Guide to Chemometrics*. 2. ed. CRC Press, 2006. p. 1–6.
27. PEREIRA FILHO, E. R. *Planejamento Fatorial Em Química: Maximizando A Obtenção De Resultados (Série Aportamentos)*. EDUFSCar, 2015.
28. WHITE, R. J. "CHAPTER 1. The Search for Functional Porous Carbons from Sustainable Precursors". IN: WHITE, R. J. (org.). *Porous Carbon Materials from Sustainable Precursors*. 1. ed. Royal Society of Chemistry, 2015. p. 3–49.
29. LIN, C. S. K.; PFALTZGRAFF, L. A.; HERRERO-DAVILA, L.; MUBOFU, E. B.; ABDERRAHIM, S.; CLARK, J. H.; KOUTINAS, A. A.; KOPSAHELIS, N.; STAMATELATOU, K.; DICKSON, F.; THANKAPPAN, S.; MOHAMED, Z.; BROCKLESBY, R.; LUQUE, R. "Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective". *Energy Environ. Sci.*, 6 (2), p. 426, 2013.
30. FAO. "Food wastage footprint & Climate Change". Disponível em: <<http://www.fao.org/nr/sustainability/food-loss-and-waste>>. Acesso em: 10 fev. 2022.
31. CEPEA/CNA/ESALQ. "PIB do agronegócio brasileiro". Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>>. Acesso em: 10 fev. 2022.
32. ABIA. "Balanço anual ABIA 2020 - Faturamento da indústria brasileira de alimentos e bebidas". Disponível em:

<<https://www.abia.org.br/downloads/Infograficoanual2020v5.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2022.

33. GODFRAY, H. C. J.; BEDDINGTON, J. R.; CRUTE, I. R.; HADDAD, L.; LAWRENCE, D.; MUIR, J. F.; PRETTY, J.; ROBINSON, S.; THOMAS, S. M.; TOULMIN, C. "Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People". *Science* (80-.), 327 (5967), p. 812–818, 12 fev. 2010.

34. ZUIN, V. G.; RAMIN, L. Z. "Green and Sustainable Separation of Natural Products from Agro-Industrial Waste: Challenges, Potentialities, and Perspectives on Emerging Approaches". *Top. Curr. Chem.*, 376 (3), 17 fev. 2018.

35. PERVAIZ, M.; CORREA, C. A. "Biorefinaria: desenvolvimento de plataformas químicas através de tecnologias integradas de biomassa". *Polímeros*, 19 (1), p. E9–E11, 2009.

36. PERLATTI, B.; FORIM, M. R.; ZUIN, V. G. "Green chemistry, sustainable agriculture and processing systems: a Brazilian overview". *Chem. Biol. Technol. Agric.*, 1 (1), p. 5, 13 dez. 2014.

37. MATHARU, A. S.; DE MELO, E. M.; HOUGHTON, J. A. "Opportunity for high value-added chemicals from food supply chain wastes". *Bioresour. Technol.*, **215**, p. 123–130, 2016.

38. ZUIN, V. G.; BUDARIN, V. L.; DE BRUYN, M.; SHUTTLEWORTH, P. S.; HUNT, A. J.; PLUCIENNIK, C.; BORISOVA, A.; DODSON, J.; PARKER, H. L.; CLARK, J. H. "Polysaccharide-derived mesoporous materials (Starbon®) for sustainable separation of complex mixtures". *Faraday Discuss.*, **202**, p. 451–464, 2017.

39. CLARK, J. H.; PFALTZGRAFF, L. A.; BUDARIN, V. L.; HUNT, A. J.; GRONNOW, M.; MATHARU, A. S.; MACQUARRIE, D. J.; SHERWOOD, J. R. "From waste to wealth using green chemistry". *Pure Appl. Chem.*, 85 (8), p. 1625–1631, 27 mar. 2013.

40. PFALTZGRAFF, L. A.; DE BRUYN, M.; COOPER, E. C.; BUDARIN, V.; CLARK, J. H. "Food waste biomass: a resource for high-value chemicals". *Green Chem.*, 15 (2), p. 307, 2013.

41. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). "Produção agrícola municipal: culturas temporárias e permanentes". Disponível em:

<<https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=766>>. Acesso em: 11 fev. 2020.

42. SAYAGO-AYERDI, S.; GARCÍA-MARTÍNEZ, D. L.; RAMÍREZ-CASTILLO, A. C.; RAMÍREZ-CONCEPCIÓN, H. R.; VIUDA-MARTOS, M. "Tropical Fruits and Their Co-Products as Bioactive Compounds and Their Health Effects: A Review". *Foods*, 10 (8), p. 1952, 22 ago. 2021.

43. VIZZOTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. "Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância". Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/44093/1/documento-316.pdf>>. Acesso em: 19 nov. 2018.

44. WINK, M. "Introduction". IN: WINK, M. (org.). *Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites*. 2. ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2010. p. 1–20.

45. BANERJEE, J.; SINGH, R.; VIJAYARAGHAVAN, R.; MACFARLANE, D.; PATTI, A. F.; ARORA, A. "Bioactives From Fruit Processing Wastes: Green Approaches to Valuable Chemicals". *Food Chem.*, **225**, p. 10–22, 2017.

46. KÜMMERER, K.; DIONYSIOU, D. D.; OLSSON, O.; FATTA-KASSINOS, D. "A path to clean water". *Science (80-.)*, 361 (6399), p. 222–224, 20 jul. 2018.

47. MARRONE, P. G. "Pesticidal natural products – status and future potential". *Pest Manag. Sci.*, p. ps.5433, 15 maio 2019.

48. SMITH, H. H.; IDRIS, O. A.; MABOETA, M. S. "Global Trends of Green Pesticide Research from 1994 to 2019: A Bibliometric Analysis". *J. Toxicol.*, **2021**, p. 1–11, 19 mar. 2021.

49. MAIA, G. B. DA S.; PINTO, A. DE R.; DE CONTI, B. M. "Agricultura sustentável". *BNDES Setorial*, **36**, p. 219–248, 2012.

50. LIMA, S. K.; GALIZA, M.; VALADARES, A.; ALVES, F. "Produção e Consumo de Produtos Orgânicos no Mundo e no Brasil". *Texto para discussão*, **2538**, 2020.

51. ASAMI, D. K.; HONG, Y.-J.; BARRETT, D. M.; MITCHELL, A. E. "Comparison of the Total Phenolic and Ascorbic Acid Content of Freeze-Dried and Air-Dried Marionberry, Strawberry, and Corn Grown Using Conventional, Organic, and Sustainable Agricultural Practices". *J. Agric. Food Chem.*, 51 (5), p. 1237–1241, fev.

2003.

52. MITCHELL, A. E.; HONG, Y.; KOH, E.; DIANE, M.; BRYANT, D. E.; DENISON, R. F.; KAFFKA, S. "Ten-Year Comparison of the Influence of Organic and Conventional Crop Management Practices on the Content of Flavonoids in Tomatoes". *J. Agric. Food Chem.*, **55**, p. 6154–6159, 2007.

53. JENSEN, W. B. "The Origin of the Soxhlet Extractor". *J. Chem. Educ.*, 84 (12), p. 1913, 1 dez. 2007.

54. RAYNIE, D. E. "Extraction". IN: WILSON, I. D. (org.). *Encyclopedia of Separation Science*. Oxford: Academic Press, 2000. p. 118–128.

55. AGRAWAL, R. "Separations: Perspective of a process developer/designer". *AIChE J.*, 47 (5), p. 967–971, maio 2001.

56. CORRÊA, A. G.; ZUIN, V. G. *Química Verde: Fundamentos E Aplicações*. 1ª Edição ed. São Carlos: Edufscar, 2012.

57. MASON, T. J.; VINATORU, M. "Ultrasonically Assisted Extraction in Food Processing and the Challenges of Integrating Ultrasound into the Food Industry". IN: *Ultrasound in Food Processing*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. p. 329–353.

58. MASON, T. J.; VINATORU, M. "Ultrasonically Assisted Extraction in Food Processing and the Challenges of Integrating Ultrasound into the Food Industry". IN: VILLAMIEL, M. et al. (org.). *Ultrasound in Food Processing: Recent Advances*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. p. 329–353.

59. AGUILERA, J. M. "Solid-Liquid Extraction". IN: TZIA, C.; LIADAKIS, G. (org.). *Extraction Optimization in Food Engineering*. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2003. p. 20.

60. BERK, Z. "Extraction". IN: BERK, Z. (org.). *Food Process Engineering and Technology*. Elsevier, 2009. p. 259–277.

61. BELLETE, B.; RAMIN, L.; PORTO, D.; RIBEIRO, A.; FORIM, M.; ZUIN, V. G.; FERNANDES, J.; SILVA, M. F. "An Environmentally Friendly Procedure to Obtain Flavonoids From Brazilian Citrus Waste". *J. Braz. Chem. Soc.*, 2018.

62. 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 (13), p. 3879–3890, 2016.

63. PRAT, D.; WELLS, A.; HAYLER, J.; SNEDDON, H.; MCELROY, C. R.; ABOUSHEHADA, S.; DUNN, P. J. "CHEM21 selection guide of classical- and less classical-solvents". *Green Chem.*, 18 (1), p. 288–296, 2016.

64. CHAVES, J. O.; DE SOUZA, M. C.; DA SILVA, L. C.; LACHOS-PEREZ, D.; TORRES-MAYANGA, P. C.; MACHADO, A. P. DA F.; FORSTER-CARNEIRO, T.; VÁZQUEZ-ESPINOSA, M.; GONZÁLEZ-DE-PEREDO, A. V.; BARBERO, G. F.; ROSTAGNO, M. A. "Extraction of Flavonoids From Natural Sources Using Modern Techniques". *Front. Chem.*, 8, p. 864, 2020.

65. ROSSI, L. M.; GALLO, J. M. R.; MATTOSO, L. H. C.; BUCKERIDGE, M. S.; LICENCE, P.; ALLEN, D. T. "Ethanol from Sugarcane and the Brazilian Biomass-Based Energy and Chemicals Sector". *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 9 (12), p. 4293–4295, 29 mar. 2021.

66. MOITY, L.; DURAND, M.; BENAZZOUZ, A.; MOLINIER, V.; AUBRY, J.-M. "In Silico Search for Alternative Green Solvents". IN: CHEMAT, F.; VIAN, M. A. (org.). *Alternative Solvents for Natural Products Extraction. Green Chemistry And Sustainable Technology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014.

67. HAN, X.; ARMSTRONG, D. W. "Ionic Liquids in Separations". *Acc. Chem. Res.*, 40 (11), p. 1079–1086, nov. 2007.

68. HAISS, A.; JORDAN, A.; WESTPHAL, J.; LOGUNOVA, E.; GATHERGOOD, N.; KÜMMERER, K. "On the way to greener ionic liquids: identification of a fully mineralizable phenylalanine-based ionic liquid". *Green Chem.*, 18 (16), p. 4361–4373, 2016.

69. PRYDDERCH, H.; HAIB, A.; SPULAK, M.; QUILTY, B.; KÜMMERER, K.; HEISE, A.; GATHERGOOD, N. "Mandelic acid derived ionic liquids: synthesis, toxicity and biodegradability". *RSC Adv.*, 7 (4), p. 2115–2126, 2017.

70. FERLIN, N.; COURTY, M.; GATARD, S.; SPULAK, M.; QUILTY, B.; BEADHAM, I.; GHAVRE, M.; HAISS, A.; KÜMMERER, K.; GATHERGOOD, N.; BOUQUILLON, S. "Biomass derived ionic liquids: Synthesis from natural organic acids, characterization, toxicity, biodegradation and use as solvents for catalytic hydrogenation processes".

Tetrahedron, 69 (30), p. 6150–6161, 2013.

71. FERLIN, N.; COURTY, M.; VAN NHIEN, A. N.; GATARD, S.; POUR, M.; QUILTY, B.; GHAVRE, M.; HAISS, A.; KÜMMERER, K.; GATHERGOOD, N.; BOUQUILLON, S. "Tetrabutylammonium prolinolate-based ionic liquids: a combined asymmetric catalysis, antimicrobial toxicity and biodegradation assessment". RSC Adv., 3 (48), p. 26241, 2013.

72. BOGDANOV, M. G. "Ionic Liquids as Alternative Solvents for Extraction of Natural Products". IN: CHEMAT, F.; VIAN, M. A. (org.). Alternative Solvents for Natural Products Extraction, Green Chemistry and Sustainable Technology. 1. ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2014. p. 127–166.

73. HANSEN, C. M. "Solubility Parameters — An Introduction". IN: HANSEN, C. (org.). Hansen Solubility Parameters: a User's Handbook. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 1–26.

74. SÁNCHEZ-CAMARGO, A. DEL P.; BUENO, M.; PARADA-ALFONSO, F.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. "Hansen solubility parameters for selection of green extraction solvents". TrAC Trends Anal. Chem., **118**, p. 227–237, set. 2019.

75. SRINIVAS, K.; KING, J. W.; MONRAD, J. K.; HOWARD, L. R.; HANSEN, C. M. "Optimization of Subcritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds Using Hansen Solubility Parameters". J. Food Sci., 74 (6), p. E342–E354, ago. 2009.

76. PAGANO, I.; SÁNCHEZ-CAMARGO, A. DEL P.; MENDIOLA, J. A.; CAMPONE, L.; CIFUENTES, A.; RASTRELLI, L.; IBAÑEZ, E. "Selective extraction of high-value phenolic compounds from distillation wastewater of basil (*Ocimum basilicum* L.) by pressurized liquid extraction". Electrophoresis, 39 (15), p. 1884–1891, ago. 2018.

77. PEREIRA, G. A.; MOLINA, G.; ARRUDA, H. S.; PASTORE, G. M. "Optimizing the Homogenizer-Assisted Extraction (HAE) of Total Phenolic Compounds from Banana Peel". J. Food Process Eng., 40 (3), p. e12438, jun. 2017.

78. KIM, D.-O.; LEE, C. Y. "Extraction and Isolation of Polyphenolics". Curr. Protoc. Food Anal. Chem., 6 (1), p. I1.2.1-I1.2.12, 2002.

79. BILGIN, M.; SAHIN, S.; DRAMUR, M. U.; SEVGILI, L. M. "Obtaining Scarlet Sage (*Salvia Coccinea*) Extract Through Homogenizer- And Ultrasound-Assisted Extraction

Methods". Chem. Eng. Commun., 200 (9), p. 1197–1209, 2 set. 2013.

80. EYIZ, V.; TONTUL, I.; TURKER, S. "Optimization of green extraction of phytochemicals from red grape pomace by homogenizer assisted extraction". J. Food Meas. Charact., 14 (1), p. 39–47, 10 fev. 2020.

81. ZUIN, V. G.; RAMIN, L. Z.; SEGATTO, M. L.; STAHL, A. M.; ZANOTTI, K.; FORIM, M. R.; DA SILVA, M. F. DAS 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., 10 set. 2020.

82. DA SILVA FRANCISCHINI, D.; 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), p. 56, 18 dez. 2020.

83. ORDÓÑEZ-SANTOS, L. E.; GARZÓN-GARCÍA, A. M. "Optimizing homogenizer-assisted extraction of chlorophylls from plantain epicarp (*Musa paradisiaca* L.)". J. Food Meas. Charact., 15 (2), p. 1108–1115, 21 abr. 2021.

84. STEFANUCCI, A.; ZENGİN, G.; LLORENT-MARTINEZ, E. J.; DIMMITO, M. P.; DELLA VALLE, A.; PIERETTI, S.; AK, G.; SINAN, K. I.; MOLLICA, A. "Viscum album L. homogenizer-assisted and ultrasound-assisted extracts as potential sources of bioactive compounds". J. Food Biochem., 44 (9), 25 set. 2020.

85. PEREIRA, J. M. G.; VIELL, F. L. G.; LIMA, P. C.; SILVA, E.; PILAU, E. J.; CORRÊA, R. C. G.; BONA, E.; VIEIRA, A. M. S. "Optimization of the extraction of antioxidants from Moringa leaves: A comparative study between ultrasound- and ultra-homogenizer-assisted extractions". J. Food Process. Preserv., 45 (6), 19 jun. 2021.

86. ROCCHETTI, G.; BLASI, F.; MONTESANO, D.; GHISONI, S.; MARCOTULLIO, M. C.; SABATINI, S.; COSSIGNANI, L.; LUCINI, L. "Impact of conventional/non-conventional extraction methods on the untargeted phenolic profile of Moringa oleifera leaves". Food Res. Int., **115**, p. 319–327, jan. 2019.

87. MANDAL, V.; MOHAN, Y.; HEMALATHA, S. "Microwave assisted extraction - An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research". Pharmacogn. Rev., 1 (1), p. 7–18, 2007.

88. KRATCHANOVA, M.; PAVLOVA, E.; PANCHEV, I. "The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin". *Carbohydr. Polym.*, 56 (2), p. 181–185, 2004.
89. LI, Y.; FABIANO-TIXIER, A.-S.; ABERT-VIAN, M.; CHEMAT, F. "Microwave-Assisted Extraction of Antioxidants and Food Colors". IN: CHEMAT, F.; CRAVOTTO, G. (org.). *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice*. Boston, MA: Springer US, 2013. p. 103–125.
90. BARKER, S. A. "Matrix solid phase dispersion (MSPD)". *J. Biochem. Biophys. Methods*, 70 (2), p. 151–162, mar. 2007.
91. SEGATTO, M. L.; ZANOTTI, K.; ZUIN, V. G. "Microwave-assisted extraction and matrix solid-phase dispersion as green analytical chemistry sample preparation techniques for the valorisation of mango processing waste". *Curr. Res. Chem. Biol.*, **1**, p. 100007, 2021.
92. MONASTERIO, R. P.; FONTANA, A. R.; SILVA, M. F. "Matrix solid-phase dispersion: a simple and fast technique for the determination of phenolic compounds in olive oil by liquid chromatography". *Anal. Methods*, 6 (22), p. 8986–8995, 16 set. 2014.
93. WIANOWSKA, D.; GIL, M. "New insights into the application of MSPD in various fields of analytical chemistry". *TrAC Trends Anal. Chem.*, **112**, p. 29–51, mar. 2019.
94. HOFF, R. B.; PIZZOLATO, T. M. "Combining extraction and purification steps in sample preparation for environmental matrices: A review of matrix solid phase dispersion (MSPD) and pressurized liquid extraction (PLE) applications". *TrAC Trends Anal. Chem.*, **109**, p. 83–96, dez. 2018.
95. TU, X.; CHEN, W. "A Review on the Recent Progress in Matrix Solid Phase Dispersion". *Molecules*, 23 (11), p. 2767, 25 out. 2018.
96. CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. "Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction". *Ultrason. Sonochem.*, 18 (4), p. 813–835, 2011.
97. LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. *Techniques And Instrumentation In Analytical Chemistry - Analytical Applications Of Ultrasound*. 1. ed.

Amsterdam: Elsevier, 2007. v. 26

98. PREECE, K. E.; HOOSHYAR, N.; KRIJGSMAN, A. J.; FRYER, P. J.; ZUIDAM, N. J. "Pilot-scale ultrasound-assisted extraction of protein from soybean processing materials shows it is not recommended for industrial usage". *J. Food Eng.*, **206**, p. 1–12, 2017.

99. GALLEGO-JUÁREZ, J. A. "Fundamentals of Ultrassound". IN: VILLAMIEL, M. et al. (org.). *Ultrasound in Food Processing*. 1. ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. p. 3–24.

100. DOLATOWSKI, Z. J.; STADNIK, J.; STASIAK, D. "Applications of ultrasound in food technology". *ACTA Sci. Pol.*, 63 (6), p. 89–99, 2007.

101. FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). "FAOSTAT: Production quantities of Mangoes, mangosteens, guavas". Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/>>. Acesso em: 17 fev. 2022.

102. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). "Produção Agrícola Municipal 2005". Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2005_v32_br.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2022.

103. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). "Produção Agrícola Municipal 2020". Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html>>. Acesso em: 17 fev. 2022.

104. CARVALHO, C. R. L.; ROSSETTO, C. J.; MANTOVANI, D. M. B.; MORGANO, M. A.; CASTRO, J. V. DE; BORTOLETTO, N. "Avaliação de cultivares de mangueira selecionadas pelo instituto agrônômico de campinas comparadas a outras de importância comercial". *Rev. Bras. Frutic.*, (19), p. 264–271, 2004.

105. MARTÍNEZ, R.; TORRES, P.; MENESES, M. A.; FIGUEROA, J. G.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; VIUDA-MARTOS, M. "Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate". *Food Chem.*, 135 (3), p. 1520–1526, 2012.

106. ZUIN, V. G.; 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), p. 617–629, 28 abr. 2020.
107. BANERJEE, J.; SINGH, R.; VIJAYARAGHAVAN, R.; MACFARLANE, D.; PATTI, A. F.; ARORA, A. "A hydrocolloid based biorefinery approach to the valorisation of mango peel waste". *Food Hydrocoll.*, 77, p. 142–151, abr. 2018.
108. TESFAYE, T.; JOHAKIMU, J. K.; CHAVAN, R. B.; SITHOLE, B.; RAMJUGERNATH, D. "Valorisation of mango seed via extraction of starch: preliminary techno-economic analysis". *Clean Technol. Environ. Policy*, 20 (1), p. 81–94, 14 jan. 2018.
109. TORRES-LEÓN, C.; ROJAS, R.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; SERNA-COCK, L.; BELMARES-CERDA, R. E.; AGUILAR, C. N. "Mango seed: Functional and nutritional properties". *Trends Food Sci. Technol.*, 55, p. 109–117, set. 2016.
110. KIM, H.; KIM, H.; MOSADDIK, A.; GYAWALI, R.; AHN, K. S.; CHO, S. K. "Induction of apoptosis by ethanolic extract of mango peel and comparative analysis of the chemical constituents of mango peel and flesh". *Food Chem.*, 133 (2), p. 416–422, 2012.
111. BERARDINI, N.; KNÖDLER, M.; SCHIEBER, A.; CARLE, R. "Utilization of mango peels as a source of pectin and polyphenolics". *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 6 (4), p. 442–452, 2005.
112. MASIBO, M.; HE, Q. "Mango Bioactive Compounds and Related Nutraceutical Properties—A Review". *Food Rev. Int.*, 25 (4), p. 346–370, 2009.
113. AMAYA-CRUZ, D. M.; RODRIGUEZ-GONZÁLEZ, S.; PÉREZ-RAMÍREZ, I. F.; LOARCA-PIÑA, G.; AMAYA-LLANO, S.; GALLEGOS-CORONA, M. A.; REYNOSO-CAMACHO, R. "Juice by-products as a source of dietary fibre and antioxidants and their effect on hepatic steatosis". *J. Funct. Foods*, 17, p. 93–102, 2015.
114. ABBASI, A. M.; LIU, F.; GUO, X.; FU, X.; LI, T.; LIU, R. H. "Phytochemical composition, cellular antioxidant capacity and antiproliferative activity in mango (*Mangifera indica* L.) pulp and peel". *Int. J. Food Sci. Technol.*, 52 (3), p. 817–826, 2017.

115. RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, S.; GUTIÉRREZ-RUIZ, I. M.; PÉREZ-RAMÍREZ, I. F.; MORA, O.; RAMOS-GOMEZ, M.; REYNOSO-CAMACHO, R. "Mechanisms related to the anti-diabetic properties of mango (*Mangifera indica* L.) juice by-product". *J. Funct. Foods*, **37**, p. 190–199, out. 2017.
116. ABDALLA, A. E. M.; DARWISH, S. M.; AYAD, E. H. E.; EL-HAMAHMY, R. M. "Egyptian mango by-product 2: Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel". *Food Chem.*, 103 (4), p. 1141–1152, 2007.
117. ASIF, A.; FAROOQ, U.; AKRAM, K.; HAYAT, Z.; SHAFI, A.; SARFRAZ, F.; SIDHU, M. A. I.; REHMAN, H. U.; AFTAB, S. "Therapeutic potentials of bioactive compounds from mango fruit wastes". *Trends Food Sci. Technol.*, **53**, p. 102–112, 2016.
118. RIBEIRO, S. M. R.; SCHIEBER, A. "Bioactive Compounds in Mango (*Mangifera indica* L.)". IN: WATSON, R. R.; PREEDY, V. R. (org.). *Bioactive Foods in Promoting Health*. London: Academic Press, 2010. p. 507–523.
119. MOROZKINA, S. N.; NHUNG VU, T. H.; GENERALOVA, Y. E.; SNETKOV, P. P.; USPENSKAYA, M. V. "Mangiferin as New Potential Anti-Cancer Agent and Mangiferin-Integrated Polymer Systems—A Novel Research Direction". *Biomolecules*, 11 (1), p. 79, 9 jan. 2021.
120. QUADRI, F.; TELANG, M.; MANDHARE, A. "Therapeutic and cosmetic applications of mangiferin: an updated patent review (patents published after 2013)". *Expert Opin. Ther. Pat.*, 29 (6), p. 463–479, 3 jun. 2019.
121. RAZA, A.; XU, X.; SUN, H.; TANG, J.; OUYANG, Z. "Pharmacological activities and pharmacokinetic study of hyperoside: A short review". *Trop. J. Pharm. Res.*, 16 (2), p. 483–489, 2017.
122. EMAM, M.; ABDEL-HALEEM, D. R.; FARAG, S. M.; EL-ANSARI, M. A.; SOBEH, M. "Larvicidal Activity of Pentagalloyl Glucose and Mangiferin Isolated from the Waste of Mango Kernel Against *Culex pipiens* L.". *Waste and Biomass Valorization*, (0123456789), 8 ago. 2021.
123. GÓMEZ-MALDONADO, D.; LOBATO-CALLEROS, C.; AGUIRRE-MANDUJANO, E.; LEYVA-MIR, S. G.; ROBLES-YERENA, L.; VERNON-CARTER, E. J. "Antifungal activity of mango kernel polyphenols on mango fruit infected by anthracnose". *LWT*,

126 (March), p. 109337, maio 2020.

124. PUIG, C. G.; REIGOSA, M. J.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; PEDROL, N. "Unravelling the bioherbicide potential of *Eucalyptus globulus* Labill: Biochemistry and effects of its aqueous extract". *PLoS One*, 13 (2), p. e0192872, 13 fev. 2018.

125. ALBOUCHI, F.; HASSEN, I.; CASABIANCA, H.; HOSNI, K. "Phytochemicals, antioxidant, antimicrobial and phytotoxic activities of *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle leaves". *South African J. Bot.*, 87 (2013), p. 164–174, jul. 2013.

126. GARCÍA-BORES, A. M.; ARCINIEGAS-ARCINIEGAS, A.; REYNA-CAMPOS, A.; CÉSPEDES-ACUÑA, C.; AVILA-SUÁREZ, B.; ALARCÓN-ENOS, J.; FLORES-MAYA, S.; ESPINOSA-GONZÁLEZ, A. M.; DE VIVAR-ROMO, A. R.; PÉREZ-PLASENCIA, C.; AVILA-ACEVEDO, J. G. "Phytochemical Composition and Biological Activities of *Dyssodia tagetiflora* Lag .". *Chem. Biodivers.*, 15 (2), p. e1700415, fev. 2018.

127. D'ABROSCA, B.; DELLAGRECA, M.; FIORENTINO, A.; ISIDORI, M.; MONACO, P.; PACIFICO, S. "Chemical constituents of the aquatic plant *Schoenoplectus lacustris*: Evaluation of phytotoxic effects on the green alga *Selenastrum capricornutum*" *J. Chem. Ecol.*, 2006.

128. JIANG, D.; HUANG, L. F.; LIN, Y. Q.; NIE, L. L.; LV, S. L.; KUANG, T. Y.; LI, Y. X. "Inhibitory effect of *Salicornia europaea* on the marine alga *Skeletonema costatum*". *Sci. China Life Sci.*, 55 (6), p. 551–558, jun. 2012.

129. XIAO, X.; LI, C.; HUANG, H.; LEE, Y. P. "Inhibition effect of natural flavonoids on red tide alga *Phaeocystis globosa* and its quantitative structure-activity relationship". *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 26 (23), p. 23763–23776, ago. 2019.

130. PANDIT, S. G.; VIJAYANAND, P.; KULKARNI, S. G. "Pectic principles of mango peel from mango processing waste as influenced by microwave energy". *LWT - Food Sci. Technol.*, 64 (2), p. 1010–1014, 2015.

131. XIA, H.; MATHARU, A. S. "Unavoidable food supply chain waste: acid-free pectin extraction from mango peel via subcritical water". *Faraday Discuss.*, **202**, p. 31–42, 2017.

132. JAMSAZZADEH KERMANI, Z.; SHPIGELMAN, A.; PHAM, H. T. T.; VAN LOEY, A. M.; HENDRICKX, M. E. "Functional properties of citric acid extracted mango peel

- pectin as related to its chemical structure". *Food Hydrocoll.*, **44**, p. 424–434, 2015.
133. BANERJEE, J.; VIJAYARAGHAVAN, R.; ARORA, A.; MACFARLANE, D. R.; PATTI, A. F. "Lemon juice based extraction of pectin from mango peels: Waste to wealth by sustainable approaches". *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 4 (11), p. 5915–5920, 2016.
134. CORDEIRO, E. M. S.; NUNES, Y. L.; MATTOS, A. L. A.; ROSA, M. F.; DE SÁ M. SOUSA FILHO, M.; ITO, E. N. "Polymer Biocomposites and Nanobiocomposites Obtained from Mango Seeds". *Macromol. Symp.*, 344 (1), p. 39–54, out. 2014.
135. HENRIQUE, M. A.; SILVÉRIO, H. A.; FLAUZINO NETO, W. P.; PASQUINI, D. "Valorization of an agro-industrial waste, mango seed, by the extraction and characterization of its cellulose nanocrystals". *J. Environ. Manage.*, **121**, p. 202–209, maio 2013.
136. VITHANA, M. D.; SINGH, Z.; JOHNSON, S. K. "Dynamics in the concentrations of health-promoting compounds: lupeol, mangiferin and different phenolic acids during postharvest ripening of mango fruit". *J. Sci. Food Agric.*, 98 (4), p. 1460–1468, mar. 2018.
137. SAFDAR, M. N.; KAUSAR, T.; NADEEM, M. "Comparison of Ultrasound and Maceration Techniques for the Extraction of Polyphenols from the Mango Peel". *J. Food Process. Preserv.*, 41 (4), p. e13028, ago. 2017.
138. GARCIA-MENDOZA, M. P.; PAULA, J. T.; PAVIANI, L. C.; CABRAL, F. A.; MARTINEZ-CORREA, H. A. "Extracts from mango peel by-product obtained by supercritical CO₂ and pressurized solvent processes". *LWT - Food Sci. Technol.*, 62 (1), p. 131–137, 2015.
139. TORRES-LEÓN, C.; ROJAS, R.; SERNA-COCK, L.; BELMARES-CERDA, R.; AGUILAR, C. N. "Extraction of antioxidants from mango seed kernel: Optimization assisted by microwave". *Food Bioprod. Process.*, **105**, p. 188–196, set. 2017.
140. MERCADO-MERCADO, G.; MONTALVO-GONZÁLEZ, E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; SÁYAGO-AYERDI, S. G. "Ultrasound-assisted extraction of carotenoids from mango (*Mangifera indica* L. 'Ataulfo') by-products on in vitro bioaccessibility". *Food Biosci.*, **21**, p. 125–131, fev. 2018.

141. GUTIÉRREZ, R. M. P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R. V. "Psidium guajava: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology". *J. Ethnopharmacol.*, 117 (1), p. 1–27, 2008.
142. MORAIS-BRAGA, M. F. B.; CARNEIRO, J. N. P.; MACHADO, A. J. T.; DOS SANTOS, A. T. L.; SALES, D. L.; LIMA, L. F.; FIGUEREDO, F. G.; COUTINHO, H. D. M. "Psidium guajava L., from ethnobiology to scientific evaluation: Elucidating bioactivity against pathogenic microorganisms". *J. Ethnopharmacol.*, 194 (November), p. 1140–1152, 2016.
143. IEA. "Estatísticas da Produção Paulista". Disponível em: <<http://bit.do/IEA-SP>>. Acesso em: 1 ago. 2019.
144. MANTOVANI, J. R.; CORRÊA, M. C. DE M.; CRUZ, M. C. P. DA; FERREIRA, M. E.; NATALE, W. "Uso fertilizante de resíduo da indústria processadora de goiabas". *Rev. Bras. Frutic.*, 26 (2), p. 339–342, 2004.
145. UCHOA, A. M. A.; DA COSTA, J. M. C.; MAIA, G. A.; SILVA, E. M. C.; CARVALHO, A. DE F. F. U.; MEIRA, T. R. "Parâmetros físico-químicos, teor de fibra bruta e alimentar de pós alimentícios obtidos de resíduos de frutas tropicais". *Segurança Aliment. e Nutr.*, 15 (2), p. 58–65, 2008.
146. EL ANANY, A. M. "Nutritional composition, antinutritional factors, bioactive compounds and antioxidant activity of guava seeds (*Psidium Myrtaceae*) as affected by roasting processes". *J. Food Sci. Technol.*, 52 (4), p. 2175–2183, 2015.
147. HABIB, M. A. "Studies on the lipid and protein composition of guava seeds (*Psidium guajava*)". *Food Chem.*, 22 (1), p. 7–16, 1986.
148. PRASAD, N. B. L.; AZEEMODDIN, G. "Characteristics and composition of guava (*Psidium guajava* L.) seed and oil". *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71 (4), p. 457–458, 1994.
149. SANCHO, S. D. O.; DA SILVA, A. R. A.; DANTAS, A. N. D. S.; MAGALHAES, T. A.; LOPES, G. S.; RODRIGUES, S.; DA COSTA, J. M. C.; FERNANDES, F. A. N.; SILVA, M. G. D. V. "Characterization of the industrial residues of seven fruits and prospection of their potential application as food supplements". *J. Chem.*, **2015**, p. 1–8, 2015.
150. BRAGA, A. P.; AMÂNCIO, A. V. D. A. F.; GONÇALVES, J. D. S.; ASSIS, L. C. D.

- S. L. C.; DE SOUZA, C. M. S.; MAIA, I. S. A. D. S.; GERRA, D. G. F. "Ruminal degradability of agro-industrial fruit residues". *Semin. Agrar.*, 37 (1), p. 279–292, 2016.
151. JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; RINCÓN, M.; PULIDO, R.; SAURA-CALIXTO, F. "Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber". *J. Agric. Food Chem.*, 49 (11), p. 5489–5493, 2001.
152. NASCIMENTO, R. J. DO; ARAÚJO, C. R. DE; MELO, E. DE A. "Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba (*Psidium guajava* L.)". *Alim. Nutr.*, **21**, p. 209–216, 2010.
153. SOUSA, B. A.; CORREIA, R. T. P. "Phenolic content, antioxidant activity and anti-amylolytic activity of extracts obtained from bioprocessed pineapple and guava wastes". *Brazilian J. Chem. Eng.*, 29 (1), p. 25–30, 2012.
154. YOU, D.-H.; PARK, J.-W.; YUK, H.-G.; LEE, S.-C. "Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of different parts of guava (*Psidium guajava* L.)". *Food Sci. Biotechnol.*, 20 (4), p. 1095–1100, 2011.
155. MARTIN, J. G. P.; PORTO, E.; CORRÊA, C. B.; ALENCAR, S. M. DE; GLORIA, E. M. DA; RIBEIRO, I. S.; CABRAL, L. M. D. A. "Antimicrobial potential and chemical composition of agro-industrial wastes". *J. Nat. Prod.*, **5**, p. 27–36, 2012.
156. CHITTURI, S.; TALATAM, V. G.; VUPPU, S. "Studies on protein content, protease activity, antioxidants potential, melanin composition, glucosinolate and pectin constitution with brief statistical analysis in some medicinally significant fruit peels". *Der Pharm. Lett.*, 5 (1), p. 13–23, 2013.
157. HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. "Antioxidant capacity of Brazilian fruit, vegetables and commercially-frozen fruit pulps". *J. Food Compos. Anal.*, 22 (5), p. 394–396, 2009.
158. DA SILVA, L. M. R.; DE FIGUEIREDO, E. A. T.; RICARDO, N. M. P. S.; VIEIRA, I. G. P.; DE FIGUEIREDO, R. W.; BRASIL, I. M.; GOMES, C. L. "Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil". *Food Chem.*, **143**, p. 398–404, 2014.
159. DENNY, C.; MELO, P. S.; FRANCHIN, M.; MASSARIOLI, A. P.; BERGAMASCHI, K. B.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. "Guava pomace: a new source of anti-

inflammatory and analgesic bioactives". *BMC Complement. Altern. Med.*, 13 (1), p. 235, 2013.

160. MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K. B.; TIVERON, A. P.; MASSARIOLI, A. P.; OLDONI, T. L. C.; ZANUS, M. C.; PEREIRA, G. E.; DE ALENCAR, S. M. "Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais Phenolic composition and antioxidant activity of agroindustrial residues". *Ciência Rural*, 41 (6), p. 1088–1093, 2011.

161. PACKER, V. G.; MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K. B.; SELANI, M. M.; VILLANUEVA, N. D. M.; DE ALENCAR, S. M.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. "Chemical characterization, antioxidant activity and application of beetroot and guava residue extracts on the preservation of cooked chicken meat". *J. Food Sci. Technol.*, 52 (11), p. 7409–7416, 2015.

162. ULUSOY, H. G.; SANLIER, N. "A minireview of quercetin: from its metabolism to possible mechanisms of its biological activities". *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 60 (19), p. 3290–3303, 27 out. 2020.

163. SHARMA, R.; SOHAL, S. K. "Bioefficacy of quercetin against melon fruit fly". *Bull. Insectology*, 66 (1), p. 79–83, 2013.

164. SELIN-RANI, S.; SENTHIL-NATHAN, S.; THANIGAIVEL, A.; VASANTHA-SRINIVASAN, P.; EDWIN, E.-S.; PONSANKAR, A.; LIJA-ESCALINE, J.; KALAIVANI, K.; ABDEL-MEGEED, A.; HUNTER, W. B.; ALESSANDRO, R. T. "Toxicity and physiological effect of quercetin on generalist herbivore, *Spodoptera litura* Fab. and a non-target earthworm *Eisenia fetida* Savigny". *Chemosphere*, **165**, p. 257–267, dez. 2016.

165. ARYA, S. S.; ROOKES, J. E.; CAHILL, D. M.; LENKA, S. K. "Vanillin: a review on the therapeutic prospects of a popular flavouring molecule". *Adv. Tradit. Med.*, 21 (3), p. 1–17, 7 set. 2021.

166. KIM, S.-I.; YOON, J.-S.; BAECK, S.-J.; LEE, S.-H.; AHN, Y.-J.; KWON, H. W. "Toxicity and Synergic Repellency of Plant Essential Oil Mixtures With Vanillin Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)". *J. Med. Entomol.*, 49 (4), p. 876–885, 1 jul. 2012.

167. SIWARUNGSON, N.; ALI, I.; DAMSUD, T. "Comparative analysis of antioxidant and antimelanogenesis properties of three local guava (*Psidium guajava* L.) varieties

of Thailand, via different extraction solvents". *J. Food Meas. Charact.*, 7 (4), p. 207–214, 22 dez. 2013.

168. SUKEKSI, L.; CHE HASSAN, C. R.; NIK SULAIMAN, N. M.; RASHIDI, H.; DAVAZDAH EMAMI, S. "Polyphenols Recovery from Tropical Fruits (Pink Guava) Wastes via Ultra-Filtration Membrane Technology Application by Optimum Solvent Selection". *Iran. J. Chem. Chem. Eng.*, 35 (3), p. 53–63, 2016.

169. HERNÁNDEZ-ACOSTA, M. A.; CASTRO-VARGAS, H. I.; PARADA-ALFONSO, F. "Integrated utilization of Guava (*Psidium guajava* L.): Antioxidant activity of phenolic extracts obtained from guava seeds with supercritical CO₂-Ethanol". *J. Braz. Chem. Soc.*, 22 (12), p. 2383–2390, 2011.

170. CASTRO-VARGAS, H. I.; RODRÍGUEZ-VARELA, L. I.; FERREIRA, S. R. S.; PARADA-ALFONSO, F. "Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava* L.) using supercritical carbon dioxide and co-solvents". *J. Supercrit. Fluids*, 51 (3), p. 319–324, 2010.

171. FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). "FAOSTAT: Production quantities of orange". Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 19 fev. 2022.

172. BORGES, A. C. G.; TOLEDO, J. C. DE. "O processo para obtenção da qualidade do suco de laranja concentrado congelado Brasileiro". *Gestão & Produção*, 6 (2), p. 97–110, ago. 1999.

173. LEDESMA-ESCOBAR, C. A.; LUQUE DE CASTRO, M. D. "Towards a comprehensive exploitation of citrus". *Trends Food Sci. Technol.*, 39 (1), p. 63–75, set. 2014.

174. DA SILVA, H. J. T.; MARQUES, P. V. "Preços e margens de comercialização da indústria de citros no Brasil". *Rev. Política Agrícola*, 24 (4), p. 114–133, 2015.

175. MILESCU, R. A.; SEGATTO, M. L.; STAHL, A.; MCELROY, C. R.; FARMER, T. J.; CLARK, J. H.; ZUIN, V. G. "Sustainable Single-Stage Solid–Liquid Extraction of Hesperidin and Rutin from Agro-Products Using Cyrene". *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 8 (49), p. 18245–18257, 14 dez. 2020.

176. MENEGUZZO, F.; CIRIMINNA, R.; ZABINI, F.; PAGLIARO, M. "Review of

Evidence Available on Hesperidin-Rich Products as Potential Tools against COVID-19 and Hydrodynamic Cavitation-Based Extraction as a Method of Increasing Their Production". *Processes*, 8 (5), p. 549, 8 maio 2020.

177. FRANCESCHINI SARRIA, A. L.; MATOS, A. P.; VOLANTE, A. C.; BERNARDO, A. R.; SABBAG CUNHA, G. O.; FERNANDES, J. B.; ROSSI FORIM, M.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. DAS G. F. "Insecticidal activity of copper (II) complexes with flavanone derivatives". *Nat. Prod. Res.*, p. 1–4, 6 jan. 2021.

178. PAPOUTSIS, K.; VUONG, Q. V.; TESORIERO, L.; PRISTIJONO, P.; STATHOPOULOS, C. E.; GKOUNTINA, S.; LIDBETTER, F.; BOWYER, M. C.; SCARLETT, C. J.; GOLDING, J. B. "Microwave irradiation enhances the in vitro antifungal activity of citrus by-product aqueous extracts against *Alternaria alternata*". *Int. J. Food Sci. Technol.*, 53 (6), p. 1510–1517, jun. 2018.

179. TRINGALI, C.; SPATAFORA, C.; CAL, V.; SIMMONDS, M. S. J. "Antifeedant constituents from *Fagara macrophylla*". *Fitoterapia*, 72 (5), p. 538–543, 2001.

180. ICH. "Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology" *Int. Conf. Harmon.*

181. HENDERSON, R. K.; HILL, A. P.; REDMAN, A. M.; SNEDDON, H. F. "Development of GSK's acid and base selection guides". *Green Chem.*, 17 (2), p. 945–949, 2015.

182. EATON, J. W.; BATEMAN, D.; HAUBERG, S.; WEHBRING, R. "{GNU Octave} version 4.2.0 manual: a high-level interactive language for numerical computations". Disponível em: <<http://www.gnu.org/software/octave/doc/interpreter>>. Acesso em: 18 set. 2019.

183. OECD. Test No. 201: Alga, Growth Inhibition Test. OECD Publishing, 2006.

184. GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. "Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium¹²³". *J. Econ. Entomol.*, 69 (4), p. 487–488, 1 ago. 1976.

185. FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. "Stages of Soybean Development". *Spec. Rep.*, 80 (March), p. 11, 1977.

186. BRUM, R. B. C. S.; CASTRO, H. G.; GAMA, F. R.; GORDON, C. H.; SANTOS,

G. R. "Fitotoxicidade de óleos essenciais em plantas de melancia, feijão e arroz". *J. Biotechnol. Biodivers.*, 5 (2), p. 101–109, 4 abr. 2014.

187. MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, C. M. *Response Surface Methodology: Process And Product Optimization Using Designed Experiments*. 3. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009.

188. PEREIRA, G. A.; MOLINA, G.; ARRUDA, H. S.; PASTORE, G. M. "Optimizing the Homogenizer-Assisted Extraction (HAE) of Total Phenolic Compounds from Banana Peel". *J. Food Process Eng.*, 40 (3), p. e12438, jun. 2017.

189. DA SILVA FRANCISCHINI, D.; 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 (56), 18 dez. 2020.

190. IKA. "Dispensores em lote - Dados técnicos". Disponível em: <<https://www.ikaprocess.com/pt/Produtos/Dispensor-em-lotes-cph-13/ULTRA-TURRAX-UTC-csb-UTC/Dados-tecnicos-cspt.html>>. Acesso em: 16 fev. 2022.

191. IKA. "Dispensores em linha - Dados técnicos". Disponível em: <<https://www.ikaprocess.com/pt/Produtos/Dispensor-em-linha-cph-6/ULTRA-TURRAX-UTL-csb-UTL2000/Dados-tecnicos-cspt.html>>. Acesso em: 16 fev. 2022.

192. FERREIRA, S. L. C.; DOS SANTOS, W. N. .; QUINTELLA, C. M.; NETO, B. B.; BOSQUE-SENDRA, J. M. "Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review". *Talanta*, 63 (4), p. 1061–1067, jul. 2004.

193. PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. "Análise de resíduos de agrotóxicos em tomates empregando dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) e cromatografia gasosa". *Quim. Nova*, 32 (1), p. 92–98, 2009.

194. BARKER, S. A. "Matrix solid-phase dispersion". *J. Chromatogr. A*, 885 (1–2), p. 115–127, jul. 2000.

195. "SiliCycle - Bulk C18 Spherical Silica Gels". Disponível em: <<https://www.silicycle.com/products/siliasphere/siliasphere-bulk-analytical-spherical-silica-gels/bonded-silica/c18>>. Acesso em: 4 fev. 2022.

196. DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D.; RADO, E. "Matrix solid-phase dispersion with sand in chromatographic analysis of essential oils in herbs". *Phytochem. Anal.*, 22

(1), p. 51–58, jan. 2011.

197. MANHITA, A. C.; TEIXEIRA, D. M.; DA COSTA, C. T. "Application of sample disruption methods in the extraction of anthocyanins from solid or semi-solid vegetable samples". *J. Chromatogr. A*, 1129 (1), p. 14–20, set. 2006.

198. RODRIGUES, S. A.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. "A simple; efficient and environmentally friendly method for the extraction of pesticides from onion by matrix solid-phase dispersion with liquid chromatography–tandem mass spectrometric detection". *Anal. Chim. Acta*, 678 (1), p. 82–89, set. 2010.

199. ROMBALDI, C.; DE OLIVEIRA ARIAS, J. L.; HERTZOG, G. I.; CALDAS, S. S.; VIEIRA, J. P.; PRIMEL, E. G. "New environmentally friendly MSPD solid support based on golden mussel shell: characterization and application for extraction of organic contaminants from mussel tissue". *Anal. Bioanal. Chem.*, 407 (16), p. 4805–4814, 30 jun. 2015.

200. YANG, X.; SUN, A.; BOADI, E. O.; LI, J.; HE, J.; GAO, X.; CHANG, Y. "A Rapid High Throughput Vibration and Vortex-Assisted Matrix Solid Phase Dispersion for Simultaneous Extraction of Four Isoflavones for Quality Evaluation of Semen Sojæ Praeparatum". *Front. Pharmacol.*, **11**, 30 out. 2020.

201. PINHEIRO, R. S.; MESQUITA, F. M. R.; FEITOSA, F. X.; SANT'ANA, H. B. DE; SANTIAGO-AGUIAR, R. S. DE. "Density, viscosity and excess properties of binary mixtures of protic ionic liquid (2-hdeaf, 2-hdeaa) + water at different temperatures". *Brazilian J. Chem. Eng.*, 35 (2), p. 383–394, jun. 2018.

202. MARTINS, M. A. R.; NEVES, C. M. S. S.; KURNIA, K. A.; CARVALHO, P. J.; ROCHA, M. A. A.; SANTOS, L. M. N. B. F.; PINHO, S. P.; FREIRE, M. G. "Densities, viscosities and derived thermophysical properties of water-saturated imidazolium-based ionic liquids". *Fluid Phase Equilib.*, **407**, p. 188–196, jan. 2016.

203. LIU, T.; ZHU, L.; WANG, J.; WANG, J.; ZHANG, J.; SUN, X.; ZHANG, C. "Biochemical toxicity and DNA damage of imidazolium-based ionic liquid with different anions in soil on *Vicia faba* seedlings". *Sci. Rep.*, 5 (1), p. 18444, 17 dez. 2015.

204. ROMERO, A.; SANTOS, A.; TOJO, J.; RODRÍGUEZ, A. "Toxicity and biodegradability of imidazolium ionic liquids". *J. Hazard. Mater.*, 151 (1), p. 268–273, fev. 2008.

205. ZHOU, J.; SUI, H.; JIA, Z.; YANG, Z.; HE, L.; LI, X. "Recovery and purification of ionic liquids from solutions: a review". *RSC Adv.*, 8 (57), p. 32832–32864, 2018.
206. TOLOSA, T.; ROGEZ, H.; SILVA, E.; SOUZA, J. "Optimization of Acid Hydrolysis of Myricetin-3-O-rhamnoside Using Response Surface Methodology". *J. Braz. Chem. Soc.*, 2018.
207. WANG, J.; ZHAO, L.-L.; SUN, G.-X.; LIANG, Y.; WU, F.-A.; CHEN, Z.; CUI, S. "A comparison of acidic and enzymatic hydrolysis of rutin". *African J. Biotechnol.*, 10 (8), p. 1460–1466, 2011.
208. HWANG, S.-C. J.; WU, J.-Y.; LIN, Y.-H.; WEN, I.-C.; HOU, K.-Y.; HE, S.-Y. "Optimal dimethyl sulfoxide biodegradation using activated sludge from a chemical plant". *Process Biochem.*, 42 (10), p. 1398–1405, out. 2007.
209. CAMP, J. E.; NYAMINI, S. B.; SCOTT, F. J. "Cyrene™ is a green alternative to DMSO as a solvent for antibacterial drug discovery against ESKAPE pathogens". *RSC Med. Chem.*, 11 (1), p. 111–117, 2020.
210. PUNTENER, W.; ZAHNER, O. *Manual For Field Trials In Plant Protection*. 2. ed. Basle, Switzerland: Ciba-Geigy, 1981.
211. QUEIROZ-SANTOS, L.; CASAGRANDE, M. M.; SPECHT, A. "Morphological Characterization of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliiothinae)". *Neotrop. Entomol.*, 47 (4), p. 517–542, 15 ago. 2018.
212. SOUZA, C. M. DE; BALDIN, E. L. L.; RIBEIRO, L. DO P.; SANTOS, T. L. B. DOS; SILVA, I. F. DA; MORANDO, R.; VENDRAMIM, J. D. "Antifeedant and growth inhibitory effects of Annonaceae derivatives on *Helicoverpa armigera* (Hübner)". *Crop Prot.*, **121**, p. 45–50, jul. 2019.
213. SAXENA, K. N. "Patterns of insect-plant relationships determining susceptibility or resistance of different plants to an insect". *Entomol. Exp. Appl.*, 12 (5), p. 751–766, 5 dez. 1969.
214. KAMARAJ, C.; RAHUMAN, A. A.; BAGAVAN, A. "Screening for antifeedant and larvicidal activity of plant extracts against *Helicoverpa armigera* (Hübner), *Sylepta derogata* (F.) and *Anopheles stephensi* (Liston)". *Parasitol. Res.*, 103 (6), p. 1361–1368, 5 nov. 2008.

215. BASKAR, K.; KINGSLEY, S.; VENDAN, S. E.; PAULRAJ, M. G.; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. "Antifeedant, larvicidal and pupicidal activities of *Atalantia monophylla* (L) Correa against *Helicoverpa armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae)". *Chemosphere*, 75 (3), p. 355–359, abr. 2009.
216. JAGLAN, M. S.; KHOKHAR, K. S.; MALIK, M. S.; SINGH, R. "Evaluation of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) Extracts against American Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner)". *J. Agric. Food Chem.*, 45 (8), p. 3262–3268, 1 ago. 1997.
217. SCHMUTTERER, H. "Properties and Potential of Natural Pesticides from the Neem Tree, *Azadirachta Indica*". *Annu. Rev. Entomol.*, 35 (1), p. 271–297, jan. 1990.
218. MUNNS, R. "Comparative physiology of salt and water stress". *Plant. Cell Environ.*, 25 (2), p. 239–250, fev. 2002.

Apêndice 1

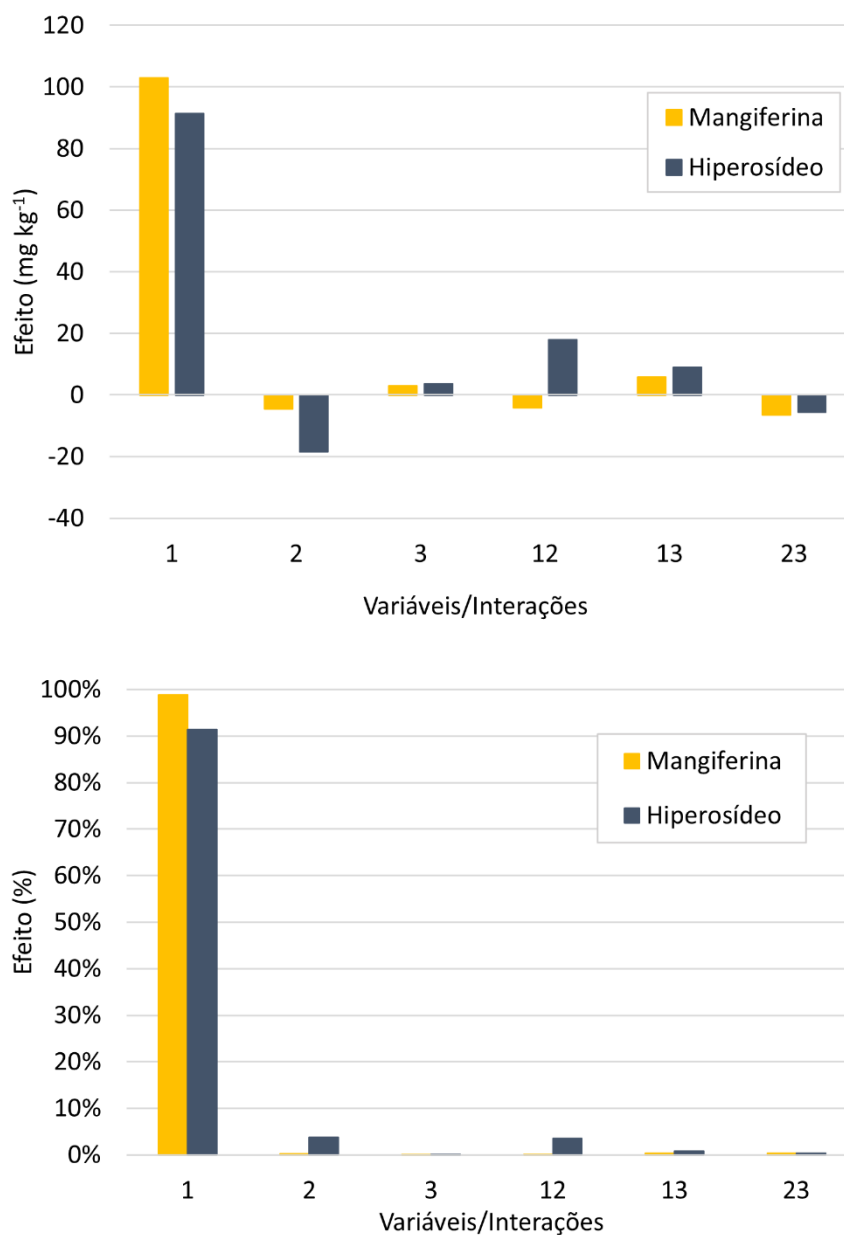


FIGURA A1.1 – Estimativa dos efeitos das variáveis em valores absolutos (superior) e em percentual (inferior) para a otimização do método EAH-EtOH com resíduo de manga.

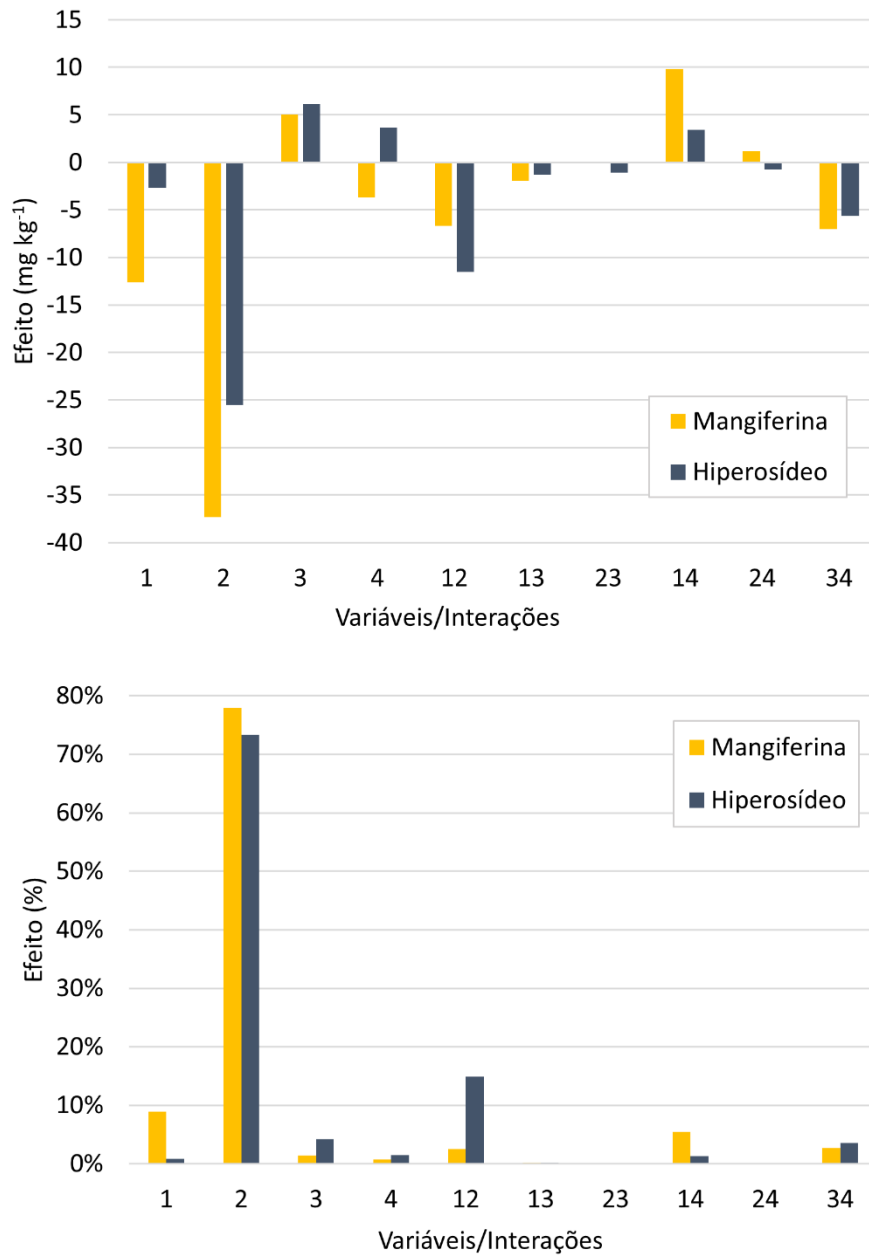


FIGURA A1.2 – Estimativa dos efeitos das variáveis em valores absolutos (superior) e em percentual (inferior) para a otimização do método EAM com resíduo de manga.

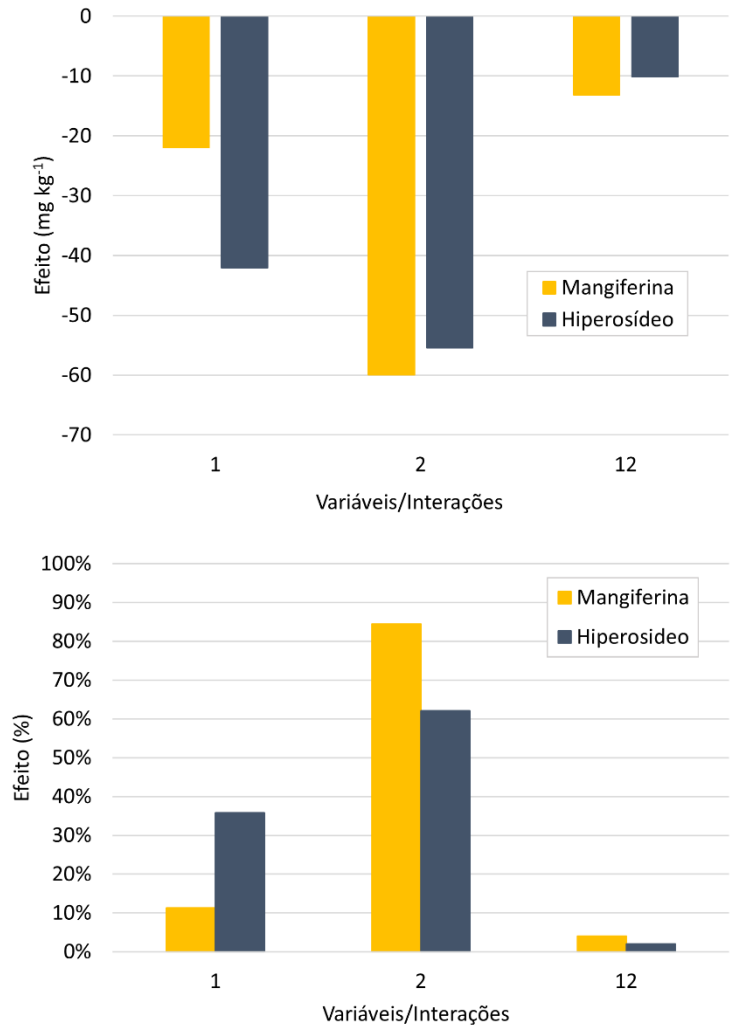


FIGURA A1.3 – Estimativa dos efeitos das variáveis em valores absolutos (superior) e em percentual (inferior) para a otimização do método DMFS com resíduo de manga.

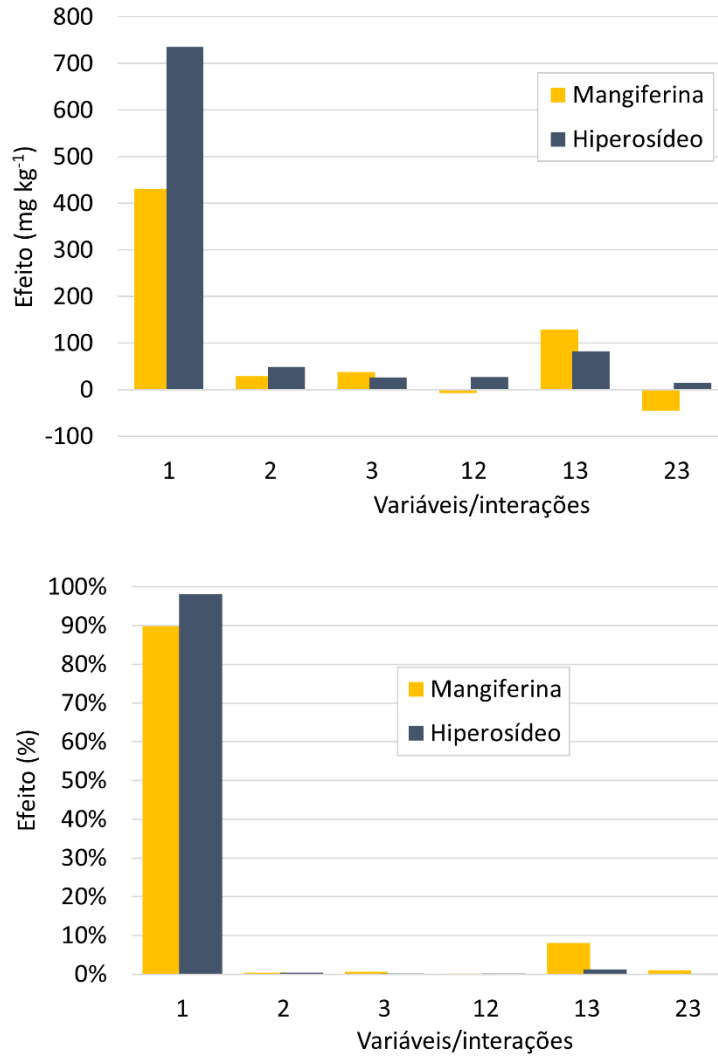


FIGURA A1.4 – Estimativa dos efeitos das variáveis em valores absolutos (superior) e em percentual (inferior) para a otimização do método EAH-ILs ($[\text{C}_8\text{MIm}]\text{Cl}$) com resíduo de manga.

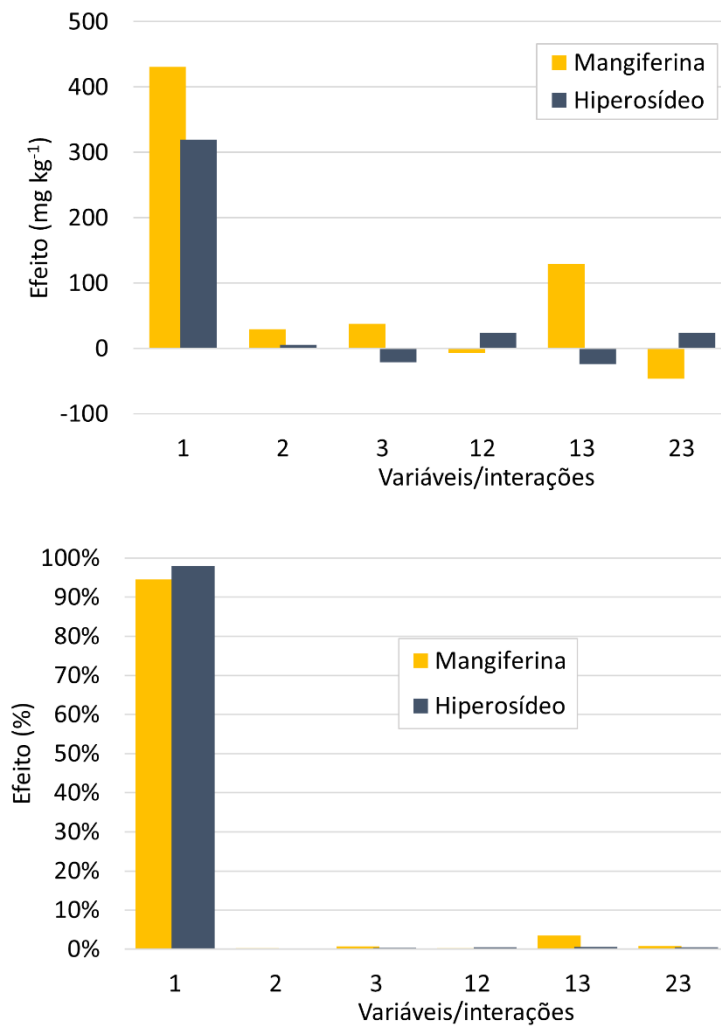


FIGURA A1.5 – Estimativa dos efeitos das varáveis em valores absolutos (superior) e em percentual (inferior) para a otimização do método EAH-ILs (acetato de colina) com resíduo de manga.

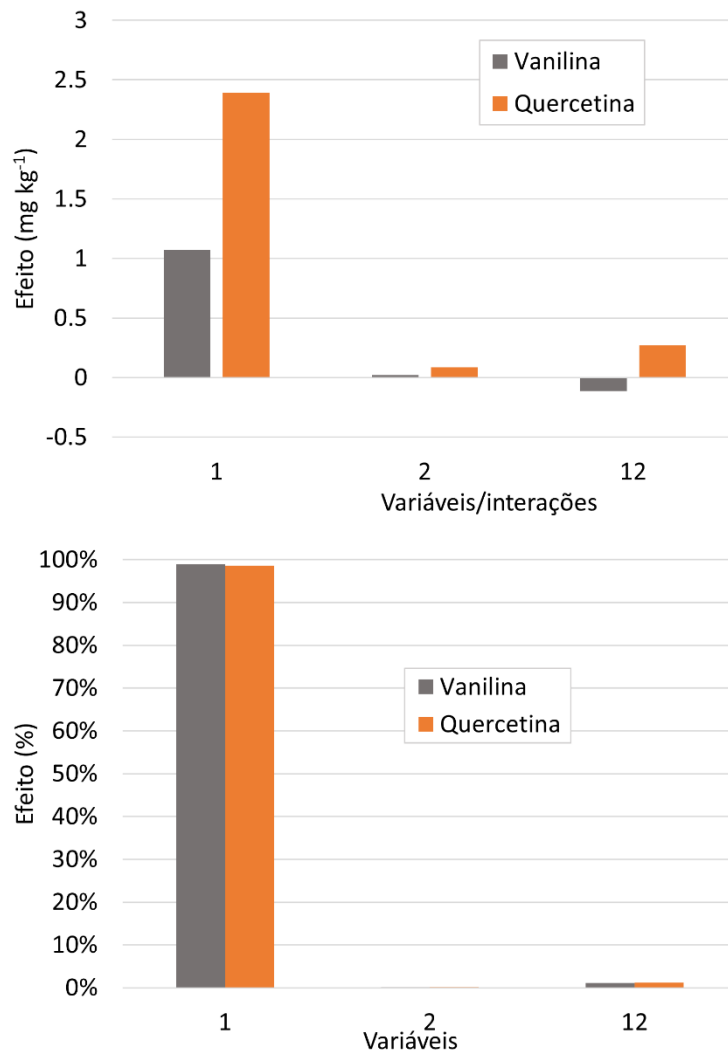


FIGURA A1.6 – Estimativa dos efeitos das varáveis em valores absolutos (superior) e em percentual (inferior) para a otimização do método EAH-HCl com resíduo de goiaba.

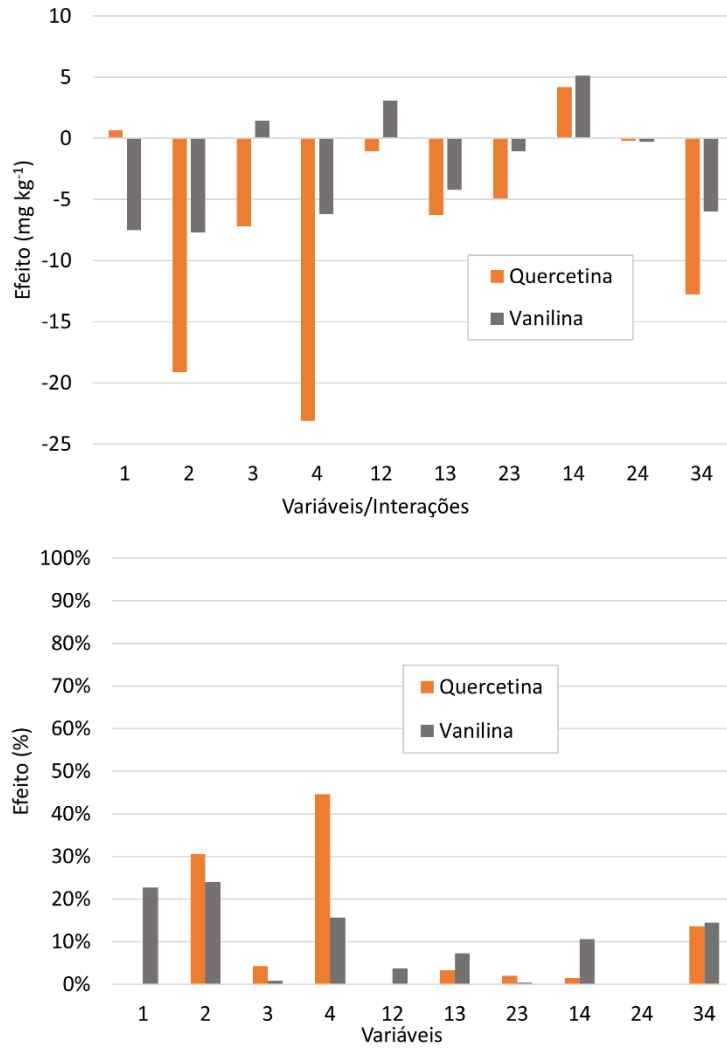


FIGURA A1.7 – Estimativa dos efeitos das varáveis em valores absolutos (superior) e em percentual (inferior) para a otimização do método EAU-HCI com resíduo de goiaba.

Apêndice 2

TABELA A2.1 – Tabela de análise de variância (ANOVA) para os modelos de mangiferina e hiperosídeo calculados para a otimização do método EAH-EtOH com resíduo de manga.

Fonte da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Estatística F	p-valor
Mangiferina (mg kg⁻¹)					
Regressão	32378	9	3597.50	149.27	1.55E-05
Resíduo	120.5	5	24.10		
Total	32498	14	2321.30		
Erro puro	6.25	2	3.13	12.19	0.08
Falta de ajuste	114.25	3	38.08		
R ²	0.996				
R ² (máx)	1.000				
Equação	Y=340,52+51,5X1-2,27X2+1,45X3-53,17X1 ² -16,16X2 ² -2,31X3 ² -2,10X1X2 +2,94X1X3-3,28X2X3				
Hiperosídeo (mg kg⁻¹)					
Regressão	24122	9	2680.30	99.95	4.17E-05
Resíduo	134.09	5	26.82		
Total	24257	14	1732.60		
Erro puro	7.67	2	3.84	10.99	0.08
Falta de ajuste	126.42	3	42.14		
R ²	0.994				
R ² (máx)	1.000				
Equação	Y = 230,04 + 45,7X1 - 9,25X2 + 1,79X3 - 39,66X1 ² - 13,51X2 ² - 0,22X3 ² - 8,94X1X2 + 4,47X1X3 - 2,83X2X3				

TABELA A2.2 – Tabela de análise de variância (ANOVA) para os modelos de mangiferina e hiperosídeo calculados para a otimização do método EAM com resíduo de manga.

Fonte da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Estatística F	p-valor
Mangiferina (mg kg⁻¹)					
Regressão	5547	14	396.18	29.01	4.45E-07
Resíduo	163.9	12	13.66		
Total	5710	26	219.63		
Erro puro	20.10	2	10.05	1.43	0.48
Falta de ajuste	143.78	10	14.38		
R ²	0.971				
R ² (máx)	0.996				
Equação	$Y=241.90 - 6.30*X1 - 18.66*X2 + 2.52*X3 - 1.83*X4 + 0.11*X1^2 - 5.18*X2^2 + 3.53*X3^2 - 6.67*X4^2 - 3.35*X1*X2 - 0.99*X1*X3 + 0.00*X2*X3 + 4.93*X1*X4 + 0.58*X2*X4 - 3.52*X3*X4$				
Hiperosídeo (mg kg⁻¹)					
Regressão	3433	14	245.19	6.97	8.83E-04
Resíduo	421.97	12	35.16		
Total	3855	26	148.26		
Erro puro	12.50	2	6.25	6.55	0.14
Falta de ajuste	409.47	10	40.95		
R ²	0.891				
R ² (máx)	0.997				
Equação	$Y=232.00 - 1.35*X1 - 12.76*X2 + 3.06*X3 + 1.83*X4 - 0.82*X1^2 - 12.82*X2^2 + 1.40*X3^2 - 0.41*X4^2 - 5.76*X1*X2 - 0.67*X1*X3 - 0.54*X2*X3 + 1.71*X1*X4 - 0.38*X2*X4 - 2.83*X3*X4$				

TABELA A2.3 – Tabela de análise de variância (ANOVA) para os modelos de mangiferina e hiperosídeo calculados para a otimização do método DMFS com resíduo de manga.

Fonte da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Estatística F	p-valor
Mangiferina (mg kg⁻¹)					
Regressão	7989	5	1597.80	19.77	1.67E-02
Resíduo	242.4	3	80.81		
Total	8231	8	1028.90		
Erro puro	12.63	2	6.32	36.39	0.03
Falta de ajuste	229.78	1	229.78		
R ²	0.971				
R ² (máx)	0.998				
Equação	Y = 324.18 - 22.01*X1 - 39.96*X2 - 25.88*X1 ² - 1.82*X2 ² - 35.19*X1*X2				
Hiperosídeo (mg kg⁻¹)					
Regressão	11147	5	2229.40	19.34	1.72E-02
Resíduo	345.82	3	115.27		
Total	11493	8	1436.60		
Erro puro	6.38	2	3.19	106.41	0.01
Falta de ajuste	339.44	1	339.44		
R ²	0.970				
R ² (máx)	0.999				
Equação	Y = 359.06 - 42.11*X1 - 36.96*X2 - 31.16*X1 ² - 2.20*X2 ² - 26.97*X1*X2				

TABELA A2.4 – Tabela de análise de variância (ANOVA) para os modelos de mangiferina e hiperosídeo calculados para a otimização do método EAH-LIs ([CaMIm] Cl) com resíduo de manga.

Fonte da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Estatística F	p-valor
Mangiferina (mg kg⁻¹)					
Regressão	395070	9	43897.00	212.88	6.40E-06
Resíduo	1031.0	5	206.21	4.77	
Total	396100	14	28293.00		
Erro puro	56.36	2	28.18	11.53	0.08
Falta de ajuste	974.67	3	324.89	19.16	
R ²	0.997	0.999			
R ² (máx)	1.000	1.000			
Equação	Y=509.72 + 215.47*X1 - 14.61*X2 + 18.78*X3 - 2.15*X1 ² + 1.85*X2 ² - 8.27*X3 ² - 3.50*X1*X2 + 64.54*X1*X3 - 23.07*X2*X3				
Hiperosídeo (mg kg⁻¹)					
Regressão	1283700	9	142640.00	369.19	1.62E-06
Resíduo	1931.80	5	386.35	4.77	
Total	1285600	14	91832.00		
Erro puro	7.78	2	3.89	164.86	0.01
Falta de ajuste	1924.00	3	641.32	19.16	
R ²	0.999	0.999			
R ² (máx)	1.000	1.000			
Equação	Y = 736.72 + 367.53*X1 + 24.30*X2 + 12.97*X3 - 226.11*X1 ² - 25.38*X2 ² - 8.40*X3 ² + 13.61*X1*X2 + 40.96*X1*X3 + 7.15*X2*X3				

TABELA A2.5 – Tabela de análise de variância (ANOVA) para os modelos de mangiferina e hiperosídeo calculados para a otimização do método EAH-LIs (acetato de colina) com resíduo de manga.

Fonte da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Estatística F	p-valor
Mangiferina (mg kg⁻¹)					
Regressão	123250	9	13694.00	73.32	8.96E-05
Resíduo	933.9	5	186.77		
Total	124180	14	8869.90		
Erro puro	4.94	2	2.47	125.36	0.01
Falta de ajuste	928.91	3	309.64		
R ²	0.992				
R ² (máx)	1.000				
Equação	Y = 287.06 + 119.67*X1 - 5.69*X2 - 6.03*X3 - 28.69*X1 ² + 19.95*X2 ² + 11.05*X3 ² + 5.44*X1*X2 + 22.94*X1*X3 + 11.46*X2*X3				
Hiperosídeo (mg kg⁻¹)					
Regressão	129850	9	14428.00	61.78	1.37E-04
Resíduo	1167.60	5	233.53		
Total	131020	14	9358.50		
Erro puro	2.89	2	1.45	268.68	0.00
Falta de ajuste	1164.70	3	388.25		
R ²	0.991				
R ² (máx)	1.000				
Equação	Y = 121.30 + 125.58*X1 + 2.20*X2 - 8.85*X3 + 20.30*X1 ² + 0.33*X2 ² + 12.59*X3 ² + 9.17*X1*X2 - 9.39*X1*X3 + 9.32*X2*X3				

TABELA A2.6 – Tabela de análise de variância (ANOVA) para os modelos de quercetina e vanilina calculados para a otimização do método EAH-HCl com resíduo de goiaba.

Fonte da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Estatística F	p-valor
Vanilina (mg kg⁻¹)					
Regressão	2	5	0.49	3.59	9.37E-02
Resíduo	0.7	5	0.14		
Total	3	10	0.31		
Erro puro	0.05	2	0.03	8.44	0.11
Falta de ajuste	0.63	3	0.21		
R ²	0.782				
R ² (máx)	0.984				
Equação	Y=4,61+0,54X1-0,01X2-0,45X1 ² -0,15X2 ² -0,06X1X2				
Quercetina (mg kg⁻¹)					
Regressão	10	5	2.09	59.17	1.90E-04
Resíduo	0.18	5	0.04		
Total	11	10	1.06		
Erro puro	0.02	2	0.01	7.04	0.13
Falta de ajuste	0.16	3	0.05		
R ²	0.983				
R ² (máx)	0.999				
Equação	Y=2,03+1,20X1+0,04X2-0,80X1 ² -0,05X2 ² +0,14X1X2				

TABELA A2.7 – Tabela de análise de variância (ANOVA) para os modelos de quercetina e vanilina calculados para a otimização do método EAU-HCl com resíduo de goiaba.

Fonte da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Estatística F	p-valor
Vanilina (mg kg⁻¹)					
Regressão	823	14	58.78	4.57	6.02E-03
Resíduo	154.2	12	12.85	2.64	
Total	977	26	37.58		
Erro puro	2.44	2	1.22	12.44	0.08
Falta de ajuste	151.78	10	15.18	19.40	
R ²	0.842	0.918			
R ² (máx)	0.998	0.999			
Equação	$Y = 33.01 - 3.75 \cdot X_1 - 3.86 \cdot X_2 + 0.72 \cdot X_3 - 3.11 \cdot X_4 - 5.57 \cdot X_1^2 - 0.88 \cdot X_2^2 + 0.87 \cdot X_3^2 + 1.67 \cdot X_4^2 + 1.53 \cdot X_1 \cdot X_2 - 2.12 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0.52 \cdot X_2 \cdot X_3 + 2.57 \cdot X_1 \cdot X_4 - 0.15 \cdot X_2 \cdot X_4 - 3.00 \cdot X_3 \cdot X_4$				
Quercetina (mg kg⁻¹)					
Regressão	5069	14	362.04	5.75	2.18E-03
Resíduo	755.53	12	62.96	2.64	
Total	5824	26	224.00		
Erro puro	19.50	2	9.75	7.55	0.12
Falta de ajuste	736.03	10	73.60	19.40	
R ²	0.870	0.933			
R ² (máx)	0.997	0.998			
Equação	$Y = 72.46 + 0.34 \cdot X_1 - 9.57 \cdot X_2 - 3.61 \cdot X_3 - 11.56 \cdot X_4 - 17.50 \cdot X_1^2 - 6.50 \cdot X_2^2 - 2.74 \cdot X_3^2 - 11.59 \cdot X_4^2 - 0.53 \cdot X_1 \cdot X_2 - 3.14 \cdot X_1 \cdot X_3 - 2.45 \cdot X_2 \cdot X_3 + 2.09 \cdot X_1 \cdot X_4 - 0.09 \cdot X_2 \cdot X_4 - 6.39 \cdot X_3 \cdot X_4$				